
Einfluss der organischen Bodensubstanz auf das Schicksal
organischer Schadstoffe und die Abundanz, Diversität und Aktivität
von Mikroorganismen-Gemeinschaften
in Böden und Boden-Mikrokompartimenten

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Dominik Neumann
aus Helmstedt

1. Referent: apl. Professor Dr. Christoph C. Tebbe
2. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn
eingereicht am: 19.12.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am: 15.05.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Neumann, D., Martens, R., Tebbe, C.C.: Partitioning of organic chemicals into soil micro-sites – Analyses of their fate and interactions with the resident microbial communities. 1. Jahreskolloquium des Schwerpunktprogramms 1315 der DFG “Biogeochemische Grenzflächen in Böden”, Leipzig (2008) (Vortrag, Poster)

Neumann, D., Martens, R., Tebbe, C.C.: Diversity of microbial communities associated with different soil particle size fractions and study of their interaction with aromatic compounds. BAGECO-10 - Bacterial Genetics and Ecology – “Coexisting on a Changing Planet” 2009 Uppsala, Schweden (2009) (Poster)

Neumann, D., Martens, R., Tebbe, C.C.: Partitioning of organic chemicals into soil micro-sites – Analyses of their fate and interactions with the resident microbial communities. 2. Jahreskolloquium des Schwerpunktprogramms 1315 der DFG “Biogeochemische Grenzflächen in Böden”, Dornburg (2009) (Vortrag, Poster)

Neumann, D., Martens, R., Tebbe, C.C.: Importance of soil spatial heterogeneity for sustaining microbial communities and their capacity to degrade phenol. Jahrestagung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Hannover (2010) (Vortrag)

Neumann, D., Martens, R., Tebbe, C.C.: Partitioning of organic chemicals into soil micro-sites – Analyses of their fate and interactions with the resident microbial communities. 3. Jahreskolloquium des Schwerpunktprogramms 1315 der DFG “Biogeochemische Grenzflächen in Böden”, Dornburg (2010) (Vortrag, Poster)

Neumann, D., Martens, R., Tebbe, C.C.: Soil organic matter as a driver for soil microbial diversity and catabolic activity - Lessons for soil sampling in context of soil metagenomics and high-throughput DNA sequencing. Soil Metagenomics, Braunschweig (2010) (Poster)

Neumann, D., Köhler, A., Martens, R., Tebbe, C.C.: Microbial diversity on soil particle surfaces and their response to soil organic matter. Ecology of Soil Microorganisms. Microbes as important drivers of soil processes. Symposium, Prague, Abstract Book p. 24. (2011) (Vortrag)

Workshopbeiträge

Neumann, D., Martens, R., Tebbe, C.C.: Interactions between organic chemicals and microbial communities associated with different soil microsites - Our experiences with soil fractionation and molecular detection techniques. Workshop on "Contribution of molecular microbial ecology methods to a better understanding of biogeochemical interfaces in soil" des Schwerpunktprogramms 1315 der DFG “Biogeochemische Grenzflächen in Böden”, Braunschweig (2009) (Vortrag)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	i
Tabellenverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	vii
1. Einleitung.....	1
1.1 Entstehung und Aufbau von Böden	1
1.2 Bedeutung der organischen Substanz für die Bodenstruktur	3
1.3 Bodenmikroorganismen und ihre Assoziation mit Aggregaten	4
1.4 Organische Schadstoffe und ihr Schicksal im Boden	6
1.5 Bedeutung der organischen Substanz in Böden	7
1.6 Bedeutung der Korngröße für die Verteilung von Mikroorganismen und für die Sorption organischer Schadstoffe	8
1.7 Untersuchungen des komplexen Bodensystems.....	9
1.8 Ziel dieser Arbeit	10
1.9 Auswahl der Böden	12
1.10 Auswahl der Schadstoffe	12
1.11 Isolierung von Boden-Mikrokompartimenten durch Korngrößenfraktionierung ...	13
1.12 Molekulargenetische Analyse von rRNA-Genen	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Lösungen und Puffer	16
2.1.3 Medien	18
2.1.4 Primer	18
2.1.5 Molekularbiologische Kits	19
2.2 Probennahme und Physikalische Aufarbeitung.....	19
2.2.1 Probennahme	19
2.2.2 Bestimmung der Bodenfeuchte.....	21
2.2.3 Fraktionierung in Korngrößen	21
2.3 Bestimmung von Bodeneigenschaften	23
2.3.1 pH-Wert-Messungen.....	23
2.3.2 Gesamtkohlenstoffgehalt.....	23
2.3.3 Gesamt CO ₂ -C	23
2.3.4 Mikrobielle Biomasse.....	24
2.3.4.1 CFI-Methode	24
2.3.4.2 CFE-Methode.....	25

2.4	Biochemische Arbeiten	26
2.4.1	Abbauversuche mit ¹⁴ C-Markierung	26
2.4.2	Adsorptionsversuche	28
2.4.3	Quantifizierung der ¹⁴ C-Aktivität	30
2.4.3.1	Erstellung der <i>Quench</i> -Kurve	31
2.4.3.2	Aktivitätsbestimmung in wässrigen Lösungen.....	31
2.4.3.3	Aktivitätsbestimmung in Bodenproben.....	32
2.5	Molekularbiologische Arbeiten	32
2.5.1	DNA-Extraktion	32
2.5.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.5.3	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.5.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	34
2.5.5	Quantitative „real-time“ PCR (qPCR)	35
2.5.5.1	Herstellung der Standards für die qPCR	37
2.5.5.2	Anwendung der qPCR zur Bestimmung von SSU rRNA-Genkopienzahlen in Bodenproben.....	39
2.5.6	T-RFLP (<i>Terminal restriction length polymorphism</i>)-Analysen	40
2.5.7	Untersuchungen von DNA mit der <i>stable isotope probing</i> (SIP)-Technik.....	43
2.5.7.1	Inkubation der Böden	44
2.5.7.2	Dichtegradientenzentrifugation.....	45
2.5.8	SSCP (<i>Single strand conformation polymorphism</i>)	48
2.5.9	Klonierung	50
2.5.10	Plasmid-Präparation.....	52
2.5.11	Sequenzierung	52
2.5.11.1	Aufarbeitung von DNA aus SSCP-Banden für die Sequenzierung.....	52
2.5.11.2	Erstellung von Klon-Bibliotheken	53
2.5.11.3	Phylogenetische Analyse der DNA-Sequenzen	54
2.6	Statistische Auswertung.....	54
3.	Ergebnisse	57
3.1	Bodeneigenschaften	57
3.2	Anpassung einer Methode zur Fraktionierung von Böden nach ihren Korngrößen für die Untersuchung von mikrobieller DNA	58
3.2.1	Kalibrierung des Ultraschallgeräts.....	58
3.2.2	Validierung der Methode	61
3.2.3	Prozentuale Verteilung der Korngrößenfraktionen bei den Bodenvarianten ...	64
3.2.4	DNA-Gehalte der nicht-fraktionierten Böden und der Korngrößenfraktionen .	65

3.3	Abundanz und Vielfalt der mit den Korngrößenfraktionen assoziierten Mikroorganismen im Vergleich dreier Bodenvarianten	67
3.3.1	Quantitative PCR von SSU rRNA-Genen.....	68
3.3.1.1	Auswahl und Validierung der Primer zur Bestimmung der Populationsgrößen der Bakterien, Archaeen und Pilze	68
3.3.1.2	Bestimmung der Mikroorganismen-Abundanz durch rRNA-Genkopienzahlen	73
3.3.2	Charakterisierung der mikrobiellen Vielfalt durch T-RFLP	76
3.4	Bedeutung der Bodenvarianten und Korngrößenfraktionen für die Sorption und den mikrobiellen Abbau von Phenol und 2,4-DCP	87
3.4.1	Sorption von Phenol und 2,4-DCP an die nicht-fraktionierten Bodenvarianten und Korngrößenfraktionen.....	87
3.4.2	Mikrobieller Abbau von Phenol und 2,4-DCP in den Bodenvarianten	97
3.4.3	Nachweis und phylogenetische Charakterisierung von Mikroorganismen, die am Abbau von Phenol und 2,4-DCP im Boden beteiligt sind	102
4.	Diskussion	116
4.1	Methodische Aspekte: Fraktionierung.....	116
4.2	Methodische Aspekte: quantitative PCR.....	121
4.3	Veränderlichkeit der mikrobiellen Abundanz	122
4.4	Einfluss des organischen Kohlenstoffs auf die mikrobielle Vielfalt in den Bodenvarianten und ihren Korngrößenfraktionen.....	128
4.5	Sorption von Phenol und 2,4-DCP am nicht-fraktionierten Boden und an den Korngrößenfraktionen	132
4.6	Abbau von Phenol in den Bodenvarianten.....	136
4.7	Abbau von 2,4-DCP in den Bodenvarianten	138
5.	Zusammenfassung.....	140
6.	Literaturverzeichnis	144
7.	Anhang	161
7.1	Primerliste	161
7.2	Weitere T-RFLP-Profile	162
7.3	Ergebnisse der Permutationstests.....	168
7.4	Übersicht über die ermittelten DNA-Sequenzen.....	169
	Danksagung.....	174

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Ausbildung eines organo-mineralischen Komplexes durch Assoziation der organischen Bodensubstanz mit Tonmineralen (verändert nach Paul 2007)	3
Abb. 2	Schematische Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Bodenbestandteile.....	11
Abb. 3	Lageplan des Langzeitdüngungsversuches Bad Lauchstädt (verändert nach Körschens <i>et al.</i> 2002)...	20
Abb. 4	Abmessungen der Probennahmequadrate einer Versuchsparzelle	20
Abb. 5	Zeitlicher Ablauf der Bodenfraktionierung	22
Abb. 6	Inkubationssystem für die Abbauprobversuche (Schematische Darstellung).....	27
Abb. 7	Quench-Kurve zur Berechnung der ¹⁴ C-Aktivität im Flüssigszintillationszähler	31
Abb. 8	Prinzip der Fluoreszenz-Detektion bei einer qPCR mit DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoffen	35
Abb. 9	Amplifikationskurven und Standardgerade eines qPCR-Laufs	36
Abb. 10	Darstellung der amplifizierten DNA-Abschnitte für den qPCR-Standard und bei der qPCR am Beispiel der <i>Fungi</i>	37
Abb. 11	Kalibriergerade zur Berechnung der Dichte in SIP-Gradientenfraktionen (abgeleitet aus Tab. 20).....	46
Abb. 12	Fraktionierung eines Dichtegradienten (Schema) und Beispiel eines linearen Dichte-Verlaufs.....	47
Abb. 13	Temperaturabnahme nach 3 min Ultraschall.....	60
Abb. 14	Temperaturänderung im Bereich von 25 bis 30 °C abgeleitet aus Abb. 13	60
Abb. 15	Korrelationen zwischen DNA- und Kohlenstoffgehalten des nicht-fraktionierten Bodens	65
Abb. 16	DNA-Gehalte der Korngrößenfraktionen NIL, NPK und FYM	66
Abb. 17	DNA-Gehalte der Bodenvarianten unter Berücksichtigung der quantitativen Korngrößenverteilung .	66
Abb. 18	Vergleich der DNA-Gehalte des nicht-fraktionierten Bodens und der Summe der Fraktionen.....	67
Abb. 19	Schematische Darstellung der getesteten qPCR-Primerpaare für die <i>Archaea</i> (siehe Tab. 38).....	68
Abb. 20	PCR-Produkte der <i>Archaea</i> -Primerpaare 1 bis 3 nach 30 PCR-Zyklen.....	69
Abb. 21	Reaktionskinetik und Standardkurven der qPCR-Testläufe mit den <i>Archaea</i> -Primerpaaren 1 und 3...	70
Abb. 22	PCR-Produkte und Schmelzkurvenanalyse der qPCR Testläufe mit den <i>Archaea</i> -Primerpaaren 1 und 3	70
Abb. 23	Vergleich der Primerbindungsstellen der PCR-Sequenzen aus der Klonierung, die Ähnlichkeiten zu <i>Planctomyces</i> aufwiesen, mit <i>Planctomyces</i> -Sequenzen in der ARB-Datenbank.....	72
Abb. 24	<i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> und <i>Fungi</i> SSU rRNA-Genkopienzahlen in den nicht-fraktionierten Böden der Varianten NIL, NPK und FYM.....	74
Abb. 25	<i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> und <i>Fungi</i> SSU rRNA-Genkopienzahlen in den Korngrößenfraktionen bezogen auf das Fraktionsgewicht (A bis C) und die Oberfläche (D bis F).	75
Abb. 26	<i>Bacteria</i> T-RFLP-Profile der nicht-fraktionierten Bodenvarianten (Restriktionsverdau mit <i>HaeIII</i>)	76
Abb. 27	UPGMA Analyse der Ähnlichkeiten der <i>Bacteria</i> T-RFLP-Profile der nicht-fraktionierten Bodenvarianten NIL, NPK und FYM.	77
Abb. 28	<i>Archaea</i> T-RFLP-Profile der nicht-fraktionierten Bodenvarianten (Restriktionsverdau mit <i>BstUI</i>)	77
Abb. 29	UPGMA Analyse der Ähnlichkeiten der <i>Archaea</i> T-RFLP-Profile (Restriktionsverdau mit <i>BstUI</i>) der nicht-fraktionierten Bodenvarianten NIL, NPK und FYM.	78
Abb. 30	<i>Fungi</i> T-RFLP-Profile der nicht-fraktionierten Bodenvarianten (Restriktionsverdau mit <i>HhaI</i>)	78
Abb. 31	UPGMA Analyse der Ähnlichkeiten der <i>Fungi</i> T-RFLP-Profile der nicht-fraktionierten Bodenvarianten NIL, NPK und FYM.....	79

Abb. 32	<i>Bacteria</i> T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit <i>HaeIII</i>).....	80
Abb. 33	UPGMA Analyse der Ähnlichkeiten der <i>Bacteria</i> T-RFLP-Profile von Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM	81
Abb. 34	<i>Archaea</i> T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit <i>BstUI</i>)	83
Abb. 35	UPGMA Analyse der Ähnlichkeiten der <i>Archaea</i> T-RFLP-Profile (Restriktionsverdau mit <i>BstUI</i>) von Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM	84
Abb. 36	<i>Fungi</i> T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit <i>HhaI</i>).....	85
Abb. 37	UPGMA Analyse der Ähnlichkeiten der <i>Fungi</i> T-RFLP-Profile von Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM	86
Abb. 38	An den Bodenvarianten sorbierte Phenol- und 2,4-DCP-Mengen nach der Zugabe unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen der Schadstoffe	88
Abb. 39	Prozentuale Sorption von Phenol- und 2,4-DCP an den Bodenvarianten NIL, NPK, FYM in Abhängigkeit von der Konzentration der Schadstoffe.....	88
Abb. 40	Freundlich-Sorptionsisothermen ($S = K_f \cdot c^B$) und dazugehörige Werte der Sorption von Phenol und 2,4-DCP der drei Bodenvarianten NIL, NPK und FYM (Köhler 2010).....	90
Abb. 41	An den Korngrößenfraktionen der drei Bodenvarianten sorbierte Phenol-Mengen bei zugegebenen Schadstoff-Konzentrationen von 0,1 mM, 1 mM und 10 mM	91
Abb. 42	An den Fraktionen sorbierte Phenol-Mengen der drei Bodenvarianten NIL, NPK, FYM unter Berücksichtigung der Korngrößenverteilung (A) und ihr prozentualer Beitrag zum Gesamtgehalt des Phenols g^{-1} Boden (B) bei zugegebenen Schadstoff-Konzentrationen von 0,1 mM, 1 mM und 10 mM	93
Abb. 43	An den Korngrößenfraktionen der drei Bodenvarianten sorbierte 2,4-DCP-Mengen bei zugegebenen Schadstoff-Konzentrationen von 0,001 mM, 0,1 mM und 10 mM.....	94
Abb. 44	An den Fraktionen sorbierte 2,4-DCP-Mengen der drei Bodenvarianten NIL, NPK, FYM unter Berücksichtigung der Korngrößenverteilung (A) und ihr prozentualer Beitrag zum Gesamtgehalt des 2,4-DCP g^{-1} Boden (B) bei zugegebenen Schadstoff-Konzentrationen von 0,001 mM, 0,1 mM und 10 mM.....	96
Abb. 45	Phenol-Abbauraten in den Bodenvarianten NIL, NPK und FYM; Darstellung der als $^{14}CO_2$ freigesetzten Radioaktivität (A) und des kumulativen Abbaus (B)	98
Abb. 46	2,4-DCP-Abbauraten in den Bodenvarianten NIL, NPK und FYM; Darstellung der als $^{14}CO_2$ freigesetzten Radioaktivität (A) und des kumulativen Abbaus der Verbindung (B)	99
Abb. 47	2,4-DCP-Abbauraten der Bodenvarianten NIL und FYM mit und ohne Zugabe einer Minerallösung.	100
Abb. 48	Gesamt- CO_2 Freisetzungsraten der Bodenvarianten mit und ohne 2,4-DCP-Zugabe	101
Abb. 49	SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der <i>Bacteria</i> aus DNA-Extrakten der Gradientenfraktionen nach 0 h, 24 h und 48 h Inkubation mit ^{13}C -Phenol zur Darstellung des Zeitverlauf des ^{13}C -Einbaus in die DNA bei der NPK-Variante.....	103
Abb. 50	SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der <i>Bacteria</i> aus DNA-Extrakten der Gradientenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach 4 und 7 d Inkubation mit nicht markiertem bzw. ^{13}C -Phenol	104
Abb. 51	SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der <i>Bacteria</i> aus DNA-Extrakten der Gradientenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach 4 und 7 d Inkubation mit ^{13}C -Phenol.....	105
Abb. 52	SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der <i>Bacteria</i> aus DNA-Extrakten der Gradientenfraktionen der Bodenvarianten NIL und FYM nach 14 d Inkubation mit ^{13}C -Phenol.....	105
Abb. 53	Zur Sequenzierung ausgewählte Banden aus den <i>Bacteria</i> SSCP-Profilen (^{13}C -Phenol).....	106
Abb. 54	Zusammensetzung der <i>Bacteria</i> -Klon-Bibliotheken aus schweren Gradientenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach 4 d Inkubation mit ^{13}C -Phenol.....	107

Abb. 55	SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU-ITS rRNA-Genen der <i>Fungi</i> aus DNA-Extrakten der Gradientenfractionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach 4 d und 7 d Inkubation mit nicht markiertem bzw. ^{13}C -Phenol.....	108
Abb. 56	SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU-ITS rRNA-Genen der <i>Fungi</i> aus DNA-Extrakten der Gradientenfractionen nach 4d und 7d Inkubation mit ^{13}C -Phenol.....	109
Abb. 57	Zur Sequenzierung ausgewählte Banden aus den <i>Fungi</i> SSCP-Profilen (^{13}C -Phenol).....	109
Abb. 58	Zusammensetzung der <i>Fungi</i> -Klon-Bibliotheken aus schweren Gradientenfractionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach 4 d Inkubation mit ^{13}C -Phenol.....	110
Abb. 59	SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU bzw. SSU/ITS rRNA-Genen der <i>Bacteria</i> und <i>Fungi</i> aus DNA-Extrakten der Gradientenfractionen von Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach 4 d Inkubation mit ^{13}C -Phenol.....	112
Abb. 60	SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der <i>Bacteria</i> aus DNA-Extrakten der Gradientenfractionen der Bodenvarianten NPK und FYM nach 9 d und 21 d Inkubation mit nicht markiertem bzw. ^{13}C -2,4-DCP.....	113
Abb. 61	SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der <i>Bacteria</i> aus DNA-Extrakten der SIP-Gradientenfractionen der Bodenvarianten NPK und FYM nach 14 d Inkubation mit ^{13}C -2,4-DCP.....	113
Abb. 62	SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der <i>Bacteria</i> aus DNA-Extrakten der Gradientenfractionen der Bodenvarianten NPK und FYM zur Darstellung des Zeitverlauf des ^{13}C -Einbaus in die DNA bei der NPK und der FYM-Variante nach 9 d, 14 d und 21 d Inkubation mit ^{13}C -2,4-DCP	114
Abb. 63	Zur Sequenzierung ausgewählte Banden aus den <i>Bacteria</i> SSCP-Profilen (^{13}C -2,4-DCP)	114
Abb. 64	Phylogenetischer Baum (Maximum likelihood) mit den klonierten Sequenzen aus den schweren Fraktionen des 2,4-DCP <i>Bacteria</i> SSCP-Gels (vgl. Abb. 63, Tab. 49) und Sequenzen aus der ARB-Datenbank	115
Abb. 65	Vergleich der SSU rRNA-Genkopienzahlen des nicht-fraktionierten Bodens und ihrer Summe in den Fraktionen unter Berücksichtigung der Korngrößenverteilung der drei Bodenvarianten NIL, NPK und FYM.....	117
Abb. 66	Korrelationen zwischen der organischen Bodensubstanz und den SSU rRNA-Genkopienzahlen der <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> und <i>Fungi</i> der nicht-fraktionierten Böden	123
Abb. 67	Verhältnis der SSU rRNA-Genkopienzahlen der (A) <i>Archaea</i> : <i>Bacteria</i> und der (B) <i>Fungi</i> : <i>Bacteria</i> in den Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM	127
Abb. 68	<i>Bacteria</i> T-RFLP-Profile der nicht-fraktionierten Bodenvarianten nach dem Restriktionsverdau mit <i>HhaI</i> bzw. <i>MspI</i>	162
Abb. 69	<i>Fungi</i> T-RFLP-Profile der nicht-fraktionierten Bodenvarianten nach dem Restriktionsverdau mit <i>HaeIII</i> bzw. <i>MspI</i>	163
Abb. 70	<i>Bacteria</i> T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit <i>HhaI</i>)	164
Abb. 71	<i>Bacteria</i> T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit <i>MspI</i>)	165
Abb. 72	<i>Fungi</i> T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit <i>HaeIII</i>)	166
Abb. 73	<i>Fungi</i> T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit <i>MspI</i>)	167

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Physikalisch-chemische Eigenschaften von Phenol und 2,4-DCP (aus IFA GESTIS-Stoffdatenbank, http://www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank)	12
Tab. 2	Charakteristika des Standortes Bad Lauchstädt (Körschens <i>et al.</i> 2002)	19
Tab. 3	Bodenfeuchte der Bodenvarianten nach der Probennahme und bei 50 % der maximalen Wasserhaltekapazität	21
Tab. 4	Zusammensetzung der ¹⁴ C-Lösungen für die Abbauprobversuche	26
Tab. 5	Zugegebene Volumina der ¹⁴ C-Lösungen und daraus resultierende Bodenfeuchten und Endkonzentrationen in den Bodenvarianten bei den Abbauprobversuchen mit ¹⁴ C-Markierung	26
Tab. 6	Schadstoff-Konzentrationen (mM) der Adsorptionsansätze	28
Tab. 7	Übersicht über die verwendeten qPCR Standards und die ermittelten DNA-Kopienzahlen der unverdünnten Plasmide	37
Tab. 8	Primerpaare für PCR-Reaktionen zur Herstellung der qPCR-Standards	38
Tab. 9	Ansätze für PCR-Reaktionen zur Herstellung der qPCR-Standards	38
Tab. 10	Thermocycler-Programme für PCR-Reaktionen zur Herstellung der qPCR-Standards	38
Tab. 11	Zusammensetzung der qPCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> und <i>Fungi</i> .	39
Tab. 12	Thermocycler-Programme für qPCR Reaktionen	40
Tab. 13	Primersysteme für die PCR-Reaktion bei der T-RFLP	41
Tab. 14	Ansätze für die PCR-Reaktion bei der T-RFLP	41
Tab. 15	Thermocycler-Protokoll für die PCR-Reaktion bei der T-RFLP	41
Tab. 16	Für den Restriktionsverdau verwendete Enzyme bei der T-RFLP	42
Tab. 17	Ansatz für den Restriktionsverdau bei der T-RFLP	42
Tab. 18	Inkubationszeiten der SIP-Versuche	44
Tab. 19	Zugegebene Volumina der Lösungen und daraus resultierende Bodenfeuchten und Endkonzentrationen in den Bodenvarianten bei den SIP-Abbauprobversuchen	45
Tab. 20	Dichte und Brechungsindex von Mischungen aus den Gradientenlösungen	45
Tab. 21	Ansatz für einen CsCl-Dichtegradienten	46
Tab. 22	Primerpaare für die SSCP-PCR Reaktionen	48
Tab. 23	Ansatz für PCR-Reaktionen mit SSCP-Primern	48
Tab. 24	Thermocycler-Programme für SSCP-PCR Reaktionen	49
Tab. 25	Ansatz für den enzymatischen Einzelstrangverdau	49
Tab. 26	Zusammensetzung eines Polyacrylamid-Gels zur Auftrennung von einzelsträngigen DNA-Fragmenten bei der SSCP	50
Tab. 27	Ligationsansatz für das pGEM®-T Vektor System II	51
Tab. 28	Ähnlichkeitsmatrix der <i>Fungi</i> T-RFLP-Profile des nicht-fraktionierten Bodens	55
Tab. 29	P-Werte des Permutationstests beim Vergleich der Bodenvarianten der <i>Fungi</i> T-RFLP-Profile des nicht-fraktionierten Bodens	56
Tab. 30	Gesamt-, anorganischer, organischer und mikrobiell gebundener Kohlenstoff der drei Bodenvarianten NIL, NPK und FYM	57
Tab. 31	pH-Werte der drei Bodenvarianten NIL, NPK und FYM (gemessen in CaCl ₂ , n=3 Wiederholungen) und Vergleich mit Literaturwerten (Körschens <i>et al.</i> 2002) und zuvor durchgeführten Messungen (R. Martens, persönliche Mitteilung)	58

Tab. 32	Temperaturänderung (ΔT) und $\Delta T/t_s$ bei unterschiedlichen Beschallungszeiten.....	59
Tab. 33	Wärmekapazität des Becherglases (C_{cont}) bei vier unabhängigen Messungen	59
Tab. 34	Biomasse-C und DNA-Gehalte nach unterschiedlicher Beschallungsdauer von 20 g Boden der FYM-Variante	62
Tab. 35	Korngrößenverteilung nach unterschiedlicher Beschallungsdauer von 20 g Boden der FYM-Variante	62
Tab. 36	DNA-Gehalte und 16S rRNA-Genkopienzahlen im Waschwasser der Bodenvarianten NIL und FYM nach den Zentrifugationschritten bei der Korngrößenfraktionierung nach Beschallung mit 30 J ml^{-1} .	63
Tab. 37	Prozentuale Korngrößenverteilung der drei Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach der Fraktionierung zur DNA-Gewinnung.....	64
Tab. 38	Neu zusammengestellte Primerpaare für den Nachweis von <i>Archaea</i> aus Boden-DNA in der qPCR...	69
Tab. 39	<i>Bacteria</i> - und <i>Fungi</i> -Primersysteme für den Nachweis dieser Gruppen aus Boden-DNA mit der qPCR	71
Tab. 40	Phylogenetische Zuordnung von Klonen, die mit dem Primerpaar A934bF/1119R erzeugte PCR-Fragmente enthielten, zu Sequenzen aus der NCBI-Datenbank	72
Tab. 41	Phylogenetische Zuordnung von Klonen, die mit dem Primerpaar NSI1/58A2R erzeugte PCR-Fragmente enthielten, zu Sequenzen aus der NCBI-Datenbank	73
Tab. 42	K_d -Werte ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$) der Sorption von Phenol und 2,4-DCP der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM	89
Tab. 43	K_{oc} -Werte ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$) der Sorption von Phenol und 2,4-DCP der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM.....	90
Tab. 44	Verteilung und Wiederauffindungsrate des ^{14}C nach 15 d Inkubation mit ^{14}C -Phenol.....	98
Tab. 45	Verteilung und Wiederauffindungsrate des ^{14}C nach 21 d Inkubation mit ^{14}C -2,4-DCP	100
Tab. 46	Verteilung und Wiederauffindungsrate des ^{14}C nach 21 d Inkubation mit ^{14}C -2,4-DCP mit und ohne Zugabe einer Minerallösung (ML)	101
Tab. 47	Phylogenetische Zuordnung der SSU rRNA-Sequenzen der Banden von ^{13}C -Phenol <i>Bacteria</i> SSCP-Profilen zu Einträgen der NCBI-Datenbank (BLAST-Analyse)	106
Tab. 48	Phylogenetische Zuordnung der SSU rRNA-Sequenzen der Banden von ^{13}C -Phenol <i>Fungi</i> SSCP-Profilen zu Einträgen der NCBI-Datenbank (BLAST-Analyse)	110
Tab. 49	Phylogenetische Zuordnung der SSU rRNA-Sequenzen der Banden von <i>Bacteria</i> SSCP-Profilen (^{13}C -2,4-DCP) zu Einträgen der NCBI-Datenbank (BLAST-Analyse)	115
Tab. 50	Spezifische Oberfläche der Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM (Köhler 2010).....	117
Tab. 51	Organische Kohlenstoffgehalte der Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM (Köhler 2010).....	118
Tab. 52	Korrelationskoeffizienten (R^2) der Beziehung zwischen den sorbierten Schadstoffmengen ($\mu\text{g g}^{-1}$ Boden) und dem C_{org} -Gehalt (mg g^{-1} Boden) bzw. der spezifischen Oberfläche ($\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ Boden) der Korngrößenfraktionen bei den Schadstoff-Konzentrationen 0,1 und 10 mM	120
Tab. 53	Korrelationskoeffizienten (R^2) der Beziehung zwischen dem DNA-Gehalt ($\mu\text{g g}^{-1}$ Boden) bzw. den SSU rRNA-Genkopienzahlen (Kopien g^{-1} Boden) mit dem C_{org} -Gehalt (mg g^{-1} Boden) bzw. der spezifischen Oberfläche ($\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ Boden) der Korngrößenfraktionen.....	125
Tab. 54	Korrelationskoeffizienten (R^2) der Beziehung zwischen dem C_{org} -Gehalt (mg g^{-1} Boden) in den vier Korngrößenfraktionen und den SSU rRNA-Genkopienzahlen (Kopien g^{-1} Boden) der <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> und <i>Fungi</i> der drei Bodenvarianten	126
Tab. 55	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Primer.....	161
Tab. 56	P-Werte der Permutationstests für den Vergleich der Bodenvariante der <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> und <i>Fungi</i> T-RFLP-Profile des nicht-fraktionierten Bodens	168
Tab. 57	P-Werte der Permutationstests für den Vergleich der Bodenvariante der <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> und <i>Fungi</i> T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen unabhängig von der Korngröße.....	168

Tab. 58	P-Werte der Permutationstests für den Vergleich der Korngrößenfraktionen der <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> und <i>Fungi</i> T-RFLP-Profile unabhängig von der Bodenvariante.....	168
Tab. 59	Ähnlichkeiten der in dieser Arbeit für die Validierung der Primerpaare bei der qPCR ermittelten DNA-Sequenzen zu Sequenzen aus der NCBI-Datenbank	169
Tab. 60	Ähnlichkeiten der in dieser Arbeit für SSCP-Banden der schweren Dichte-Fractionen ermittelten DNA-Sequenzen zu Sequenzen aus der NCBI-Datenbank	170
Tab. 61	<i>Bacteria</i> Klon-Bibliothek der schweren Dichte-Fractionen der Bodenvariante NIL nach Inkubation mit ¹³ C-Phenol und DNA-SIP.....	170
Tab. 62	<i>Bacteria</i> Klon-Bibliothek der schweren Dichte-Fractionen der Bodenvariante NPK nach Inkubation mit ¹³ C-Phenol und DNA-SIP.....	171
Tab. 63	<i>Bacteria</i> Klon-Bibliothek der schweren Dichte-Fractionen der Bodenvariante FYM nach Inkubation mit ¹³ C-Phenol und DNA-SIP.....	172
Tab. 64	<i>Fungi</i> Klon-Bibliothek der schweren Dichte-Fractionen der Bodenvariante NIL nach Inkubation mit ¹³ C-Phenol und DNA-SIP.....	172
Tab. 65	<i>Fungi</i> Klon-Bibliothek der schweren Dichte-Fractionen der Bodenvariante NPK nach DNA-SIP und Inkubation mit ¹³ C-Phenol.....	173
Tab. 66	<i>Fungi</i> Klon-Bibliothek der schweren Dichte-Fractionen der Bodenvariante FYM nach DNA-SIP und Inkubation mit ¹³ C-Phenol.....	173

Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2,4-DCP	2,4-Dichlorphenol
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>analysis of variance</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , Überbegriff für eine Sammlung der weltweit am meisten genutzten Programme zur Analyse biologischer Sequenzdaten
BSA	Bovines Serumalbumin
Bp	Basenpaar(e)
Bq	Becquerel
C _{anorg}	Anorganischer Kohlenstoff
CFE	Chloroformbegasungs-Extraktions-Methode (engl. <i>chloroform fumigation extraction</i>)
CFI	Chloroformbegasungs-Inkubations-Methode (engl. <i>chloroform fumigation incubation</i>)
C _{org}	Organischer Kohlenstoff
CPM	Gemessener radioaktiver Zerfall pro Minute (engl. <i>counts per minute</i>)
Ct	PCR-Zyklen bis zum Erreichen eines Schwellenwertes (engl. <i>cycle threshold</i>) bei der qPCR
d	Tage
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribo-Nucleosidtriphosphat
DPM	Radioaktiver Zerfall pro Minute (engl. <i>disintegrations per minute</i>)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EB	Elutions-Puffer (engl. <i>elution buffer</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E	Effizienz der qPCR Reaktion
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
F, f	vorwärts (engl. <i>forward</i>)
FYM	mineralisch und organisch gedüngte Bodenvariante
IFA	Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITS	engl. <i>internal transcribed spacer</i>
kBq	Kilo-Becquerel
K _d	Verteilungskoeffizient
K _{OC}	Verteilungskoeffizient unter Berücksichtigung des Kohlenstoffgehaltes
lg	Dekadischer Logarithmus
LB	Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien (engl. <i>lysogeny broth</i>)
LAXI	LB-Medium mit Zugabe von Ampicillin, X-Gal, und IPTG
LSC	Flüssigszintillationszähler (engl. <i>liquid scintillation counter</i>)
LSU	Große Untereinheit eines Ribosoms (engl. <i>large subunit</i>)
mA	Milli-Ampère
MBq	Mega-Bequerel

MDE®-Lösung	<i>Mutation Detection Enhancement</i> -Lösung für SSCP-Gele
n	Stichprobenumfang
NIL	ungedüngte Bodenvariante
NPK	mineralisch gedüngte Bodenvariante
n. b.	nicht bestimmt
NC	Negativkontrolle (engl. <i>negative control</i>)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTC	Kontrolle ohne <i>Template</i> -Zugabe (<i>non template control</i>)
OTU	Einzeldaten (z. B. eine Sequenz oder ein Organismus) oder eine Gruppe zusammengefasster Daten bei phylogenetischen Untersuchungen (engl. <i>operational taxonomic unit</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität, ein Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung.
pK _s	Negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion (<i>real-time PCR</i>)
R ²	Bestimmtheitsmaß
RDP	Ribosomal Database Project
S	Svedberg-Einheit
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SIP	Stabile Isotopen Sondierung (engl. <i>stable isotope probing</i>)
SSCP	Genetische Fingerabdruck-Methode, bei der einzelsträngige DNA elektrophoretisch nach ihrer Basenabfolge aufgetrennt wird (engl. <i>single strand conformation polymorphism</i>)
SSU	Kleine Untereinheit eines Ribosoms (engl. <i>small subunit</i>)
TBE	Tris-Borsäure-Puffer mit EDTA
TE	Tris/EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N,N, Tetramethylethylenamin
TG	Trockengewicht
T-RFLP	Genetische Fingerabdruck-Methode, bei der mit Restriktionsendonucleasen geschnittene DNA-Fragmente elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt werden (engl. <i>terminal restriction fragment length polymorphism</i>)
U	Enzymeinheit (engl. <i>unit</i>)
U min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vs.	gegenüber gestellt (lat. <i>versus</i>)
WHK _{max}	Maximale Wasserhaltekapazität
X-Gal	5-Brom-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid

IUPAC Nukleotid Code für DNA- bzw. RNA-Sequenzen

Abkürzung	Base
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T (oder U)	Thymin (oder Uracil)
R	A oder G
Y	C oder T
S	G oder C
W	A oder T
K	G oder T
M	A oder C
B	C oder G oder T
D	A oder G oder T
H	A oder C oder T
V	A oder C oder G
N	beliebige Base

1. Einleitung

Boden ist ein Naturkörper, der die gesamte nicht-wässrige Erdoberfläche umspannt. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Sorption, Speicherung, Freisetzung und dem Transport von Energie, Wärme, Wasser, Gasen, sowie Nähr- und Schadstoffen. Im Boden ablaufende biogeochemische Prozesse liefern die Grundlage für viele wichtige Ökosystemfunktionen, die u. a. die Regulation der Atmosphäre, den Abbau von organischen Reststoffen oder die Unterstützung des Pflanzenwachstums beinhalten. Der auch als Pedosphäre bezeichnete Boden beinhaltet als funktionell entscheidende Komponente natürliche Grenzschichten zwischen der Gesteinsschicht (Lithosphäre) und der Biosphäre am Übergang zur Atmosphäre. Die Pedosphäre besteht aus unterschiedlichen zueinander in Kontakt stehenden organischen, anorganischen und biologischen Bestandteilen. Sie kann daher als komplexe, hierarchisch strukturierte und extrem große Grenzfläche zu den Bodenflüssigkeits- und Gasphasen, die sich durch und innerhalb der Poren und Zwischenräume des Bodens erstrecken, aufgefasst werden (Totsche *et al.* 2010).

Die physikalische, chemische und biologische Heterogenität der Bodenstruktur fördert die Ausbildung einer Vielzahl an Lebensräumen, die eine enorme biologische und funktionelle Abundanz und Diversität an Mikroorganismen aufweisen können, und den Boden in einen komplexen biologischen Reaktionsraum verwandeln (Curtis & Sloan 2005). Um in Hinblick auf die steigende Weltbevölkerung eine nachhaltige Produktion von Nahrungsmitteln mit höherer Intensität für höhere Erträge betreiben zu können, ist ein detaillierteres Verständnis über die Vorgänge in Böden notwendig, um daraus Maßnahmen zum Schutz von Bodenfunktionen abzuleiten. Um die komplexe Struktur von Böden verstehen zu können, soll hier auf deren Entstehung kurz eingegangen werden.

1.1 Entstehung und Aufbau von Böden

Die Entstehung von Böden beginnt mit der Verwitterung von Gesteinen durch klimatische Einflüsse wie Wind, Feuchtigkeit oder Wärme, wodurch es zu einer Fragmentierung in kleinere Gesteinspartikel kommt. Dieses Material liefert eine Nische für Mikroorganismen, kleinere Tiere und Pflanzen. Die Stoffwechselaktivitäten dieser Lebewesen beschleunigen den weiteren Degradationsprozess der Gesteinspartikel und führen organisches Material in das System ein. Sie führen auch zur Ausbildung von Bodenhorizonten, die durch unterschiedliche physikochemische und biologische Eigenschaften gekennzeichnet sind. Da sowohl die physikalische, als auch die biologische Gesteinsverwitterung stark von der Verfügbarkeit von Wasser, Sauerstoff und Licht abhängen, findet die Bodenbildung ausschließlich innerhalb eines relativ kleinen Bereichs am oberen Rand der Erdkruste statt. Für das Leben auf der Erdoberfläche ist vor allem die oberste Schicht dieses Bodenbereichs, der A-Horizont (Oberboden), von Bedeutung. Hier ist der Verwitterungsprozess typischerweise weit fortgeschritten, so dass dort vorwiegend kleine mineralische Bodenpartikel mit einem Durchmesser $< 250 \mu\text{m}$ vorliegen. Je nach Partikelgröße werden

hierbei Sand (63-2000 μm), Schluff (2-63 μm) und Ton (< 2 μm) unterschieden (Klassifizierung nach EN ISO 14688). Diese Mineralpartikel verbinden sich mit organischen Bestandteilen und bilden unterschiedlich große und beschaffene Aggregate, die zu einer insgesamt heterogenen Bodenstruktur führen (Tisdall & Oades 1982).

Von den mineralischen Bodenbestandteilen sind insbesondere die Tonminerale, die typischerweise aus blättchenförmigen Teilchen mit einem Durchmesser von weniger als 2 μm bestehen, für die Bodenstruktur maßgeblich. Durch ihre geringe Größe verleihen sie Böden eine hohe Plastizität, Quellfähigkeit und das Vermögen Ionen und Moleküle zu sorbieren. Aufgrund ihrer großen Oberfläche erhöhen sie außerdem die Kationenaustauschkapazität eines Bodens, die eine wichtige Rolle bei der Nährstoffversorgung von Pflanzen spielt und weitere Bodeneigenschaften wie den Wasserhaushalt und die biologische Aktivität beeinflusst.

Pflanzenreste bilden die Hauptquelle des organischen Materials im Boden (Pelz *et al.* 2005). Unmittelbar nach ihrem Eintrag finden zahlreiche enzymatische, chemische und physikalische Prozesse statt, die zur Bildung einer im Zeitverlauf zunehmend stabilen organischen Bodensubstanz führen. Zu dieser zählen neben den Pflanzenresten auch die Mikroorganismen, sowie Abbauprodukte von Tieren, organische Produkte aus biologischen Stoffwechselprozessen und vom Menschen eingebrachtes organisches Material, z. B. zur Bodendüngung (Kögel-Knabner 2002). Bei der organischen Bodensubstanz wird zwischen Streu- und Huminstoffen unterschieden. Zu den Streustoffen zählen nicht oder nur schwach umgewandelte Zellbestandteile und -inhaltsstoffe wie Polysaccharide, Proteine, Lipide, Nukleinsäuren oder auch Lignin. Die Huminstoffe bestehen dagegen aus uneinheitlichen hochmolekularen, aber strukturell und funktionell ähnlichen, stark umgewandelten Produkten, die aus unvollständig abgebauten organischen Verbindungen im Prozess der Humifizierung gebildet werden.

Die organische Bodensubstanz bildet als Kohlenstoff- und Energiequelle die Lebensgrundlage für heterotrophe Bodenorganismen. Außerdem strukturiert sie als Baumaterial den biologischen Lebensraum. Andererseits setzen Bodenorganismen durch ihre Aktivität essentielle Nährstoffe wie z. B. Stickstoff aus Pflanzenresten frei und machen diese so wieder für Pflanzen und andere Bodenorganismen zugänglich. Daher besteht eine enge Beziehung zwischen dem Gehalt an organischer Substanz und der biologischen Aktivität von Mikroorganismen im Boden. Während viele Streustoffe nur eine kurze Verweildauer im Boden haben und schnell umgesetzt werden, sind einige von ihnen, wie z. B. Lignin, und die Huminstoffe aufgrund ihrer strukturell bedingten Eigenschaften nur schwer mikrobiell abbaubar (rekalzitran) und reichern sich daher im Boden an. Die organische Bodensubstanz ist jedoch nicht nur Nährstofflieferant und Struktursubstrat, sondern erfüllt weitere wichtige Funktionen. So stellt sie aufgrund ihrer Oberfläche einen wichtigen Sorbenten für organische und anorganische Stoffe in der Bodenlösung dar und bildet so einen natürlichen Kohlenstoff- und Nährstoffspeicher. Da sie sowohl hydrophile wie auch hydrophobe Bereiche beinhaltet, wird mit steigender organischer Substanz sowohl

die Kationenaustauschkapazität des Bodens als auch die Sorptionsfähigkeit für schwer lösliche organische Verbindungen, beispielsweise für viele organische Schadstoffe (z. B. Polyzyklische aromatische Wasserstoffe; PAKs), erhöht.

Die Masse der organischen Bodensubstanz macht in den meisten landwirtschaftlich genutzten Oberböden zwar nur wenige Prozentanteile aus, hat aber entscheidenden Einfluss auf alle Bodenfunktionen. Sie spielt damit eine zentrale Rolle im globalen terrestrisch vermittelten Kohlenstoffkreislauf. Die Rückfuhr des gebundenen Kohlenstoffs aus Boden in die Atmosphäre erfolgt überwiegend über die Bodenatmung, d. h. die Bildung von Kohlendioxid (CO_2) durch mikrobielle Oxidationsprozesse. Der im System verbleibende nicht mineralisierte Kohlenstoffanteil geht in die langfristig festgelegte organische Bodensubstanz über. Dieser Kohlenstoff unterliegt Stabilisierungsprozessen im Boden, die ihn weitgehend vor einem mikrobiellen Abbau schützen. Bei gleichbleibenden Umwelt- und Vegetationsverhältnissen stellt sich im Boden damit ein Gleichgewicht zwischen dem Eintrag von organischem Kohlenstoff und dessen Ab- und Umbau ein (Blume *et al.* 2010).

1.2 Bedeutung der organischen Substanz für die Bodenstruktur

Die organische Substanz ist für die Ausbildung einer stabilen Bodenstruktur durch Gefügebildung und Aggregation von zentraler Bedeutung. Nicht mineralisierte Streustoffe und die meisten Huminstoffe gehen schnell Verbindungen mit Mineralen und Oxiden ein und bilden mit diesen organo-mineralische Komplexe aus (Abb. 1).

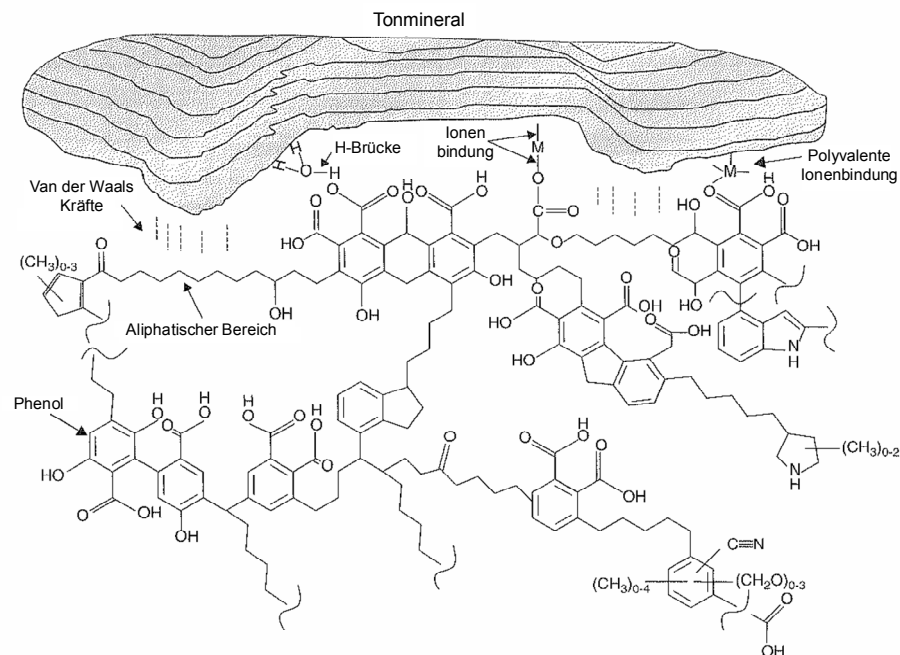


Abb. 1 Ausbildung eines organo-mineralischen Komplexes durch Assoziation der organischen Bodensubstanz mit Tonmineralen (verändert nach Paul 2007).

Die Sorption erfolgt dabei vor allem durch Ionenbindungen zwischen der negativ geladenen Oberfläche der Minerale, polyvalenten Kationen in der Bodenlösung und den funktionellen Gruppen der organischen Verbindungen (Sposito 1984). Auch andere Bindungstypen, beispielsweise Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen (Van der Waals-Kräfte), spielen eine Rolle. Dabei können gleichzeitig mehrere Bindungsarten wirksam sein. Diese Bindungen führen zu einem Schutz der organischen Substanz vor einem Abbau durch mikrobielle Enzyme und erhöhen ihre Verweilzeit im Boden. Durch die unterschiedlichen Formen und Größen der Mineralpartikel, die mit der organischen Substanz in Wechselwirkung treten, kommt es zur Ausbildung von vielfältig unterschiedlichen Aggregatstrukturen. Diese heterogenen Aggregate können sich erheblich in ihrer physikalischen und zeitlichen Stabilität unterscheiden.

Bei der Aggregation bilden die Mineralteilchen zunächst kleinere Strukturen, Mikroaggregate $< 20\ \mu\text{m}$, die sich typischerweise zu etwas größeren Aggregaten ($20\text{-}250\ \mu\text{m}$) zusammenlagern können. Die Bestandteile der Aggregate werden dabei vor allem durch von Mikroorganismen gebildete Polysaccharide und Proteine „verklebt“ und so stabilisiert. Durch den Einfluss von Wurzeln und Pilzhyphen, die die Mikroaggregate umgeben und zu größeren Aggregaten vernetzen, entstehen dann die weniger strukturstabilen Makroaggregate ($> 250\ \mu\text{m}$). Zwischen den Makroaggregaten befinden sich Hohlräume und Poren unterschiedlicher Größe, die in vielen Böden etwa 50 % des gesamten Bodenvolumens ausmachen können. Diese Poren können mit Gas oder mit Wasser und darin gelösten anorganischen und organischen Verbindungen gefüllt sein. Böden, mit ihren Aggregatstrukturen und dem Nebeneinander der drei Phasen fest, flüssig und gasförmig weisen damit eine große Vielfalt an Lebensräumen (Mikrokompartimenten) für Bodenmikroorganismen auf (Paul 2007).

1.3 Bodenmikroorganismen und ihre Assoziation mit Aggregaten

Mikroorganismen, insbesondere Bakterien und Pilze, sind zu einem Großteil für die Mineralisierung und Humifizierung der organischen Substanz verantwortlich und an allen Nährstoff- und Schadstoffkreisläufen im Boden beteiligt. Durch ihre Wechselwirkungen und ihr Zusammenspiel mit den abiotischen Bodenbestandteilen sowie den Pflanzen und Tieren, und auch untereinander, bilden sie die Grundlage für viele wichtige Bodenfunktionen. Die typischerweise einzelligen Bakterien (*Bacteria*) stellen die zahlenmäßig größte Gruppe der Bodenmikroorganismen dar. Mit einem Durchmesser von $0,2$ bis $5\ \mu\text{m}$ sind Bakterien kleiner und damit befähigt andere Lebensräumen zu besiedeln als z. B. die deutlich größeren Pilze. Sie können außer- und innerhalb der Aggregate lokalisiert sein. Ihr Überleben hängt dabei entscheidend von der Wasser- Sauerstoff- und Nährstoffverfügbarkeit, sowie den in ihrem Habitat verfügbaren Substraten ab (Killham *et al.* 1993). Ihre Verteilung in Böden ist daher sehr ungleichmäßig (heterogen). Bevorzugt liegen sie mit kleineren Bodenpartikeln ($< 20\ \mu\text{m}$) assoziiert und innerhalb von Poren mit einem Durchmesser $< 10\ \mu\text{m}$ in den Mikroaggregaten vor (Hattori 1988). Durch die

räumliche Nähe zu Mineralteilchen mit angelagerter organischer Substanz, befinden sie sich unmittelbar an ihrer Nahrungsquelle. Zwar liegt die an Mineralpartikel gebundene organische Substanz meist in humifizierter Form vor und ist zu großen Teilen physikalisch gegenüber einem Abbau durch bakterielle Enzyme geschützt (Gregorich *et al.* 1989), dennoch sind in dieser auch leichter abbaubare Substanzen enthalten (Schulten & Leinweber 1999).

In Mikroporen sind die Bodenbakterien vor Austrocknung, wasserlöslichen toxischen Substanzen, und größeren Fraßfeinden, wie z. B. Protozoen, geschützt (Postma & van Veen 1990, Wright *et al.* 1995). Da ihre Nährstoffe und Substrate sie dort jedoch schwerer erreichen, müssen sie an die entsprechenden Bedingungen angepasst sein, beispielsweise durch langsames Wachstum oder durch die Fähigkeit mit hoher Affinität Substrate aufzunehmen. Da der Sauerstoffverbrauch in den Poren auch schnell zu anaeroben Bedingungen führen kann, besitzen viele dort lebende Bakterien alternative Atmungswege, bei denen z. B. Nitrat oder Sulfat statt Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor verwendet wird (Philippot *et al.* 1996).

Bakterien zeichnen sich insgesamt durch eine hohe Anpassungsfähigkeit und Stoffwechselvielfalt aus. Einige Vertreter können in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen eine Vielzahl an Substraten verwerten. Andere sind Spezialisten, die in der Lage sind auch für andere Mikroorganismen den Abbau von anderenfalls unzugänglichen Verbindungen, z. B. bestimmten Xenobiotika, zu initiieren. Ihre räumliche Verteilung innerhalb der Bodenmatrix spielt daher eine wichtige Rolle für ihre Funktion als Lieferant und bei der Freisetzung von Nährstoffen.

Archaeen (*Archaea*) unterscheiden sich in ihrem strukturellen Aufbau, z. B. der Zellwand und den enthaltenen Lipiden, von den Bakterien und werden aufgrund phylogenetischer Analysen als eine eigenständige prokaryotische Domäne betrachtet (Woese *et al.* 1990). Ein Großteil der bisher bekannten Archaeen zeichnet sich durch die Besiedlung extremer Habitate, z. B. solcher mit hohen Temperaturen oder Salzgehalten, aus. Außerdem sind methanogene *Archaea* die einzigen Organismen die zur Bildung von Methan befähigt sind. Kultivierungsunabhängige Untersuchungen zeigen jedoch, dass andere Archaeen, vor allem aus der Abteilung der *Crenarchaeota*, in hoher Abundanz in nahezu allen terrestrischen Habitaten vorkommen (Ochsenreiter *et al.* 2003). Über ihre Funktion im Boden ist bisher nur wenig bekannt (Schleper *et al.* 2005). Es gibt jedoch deutliche Hinweise darauf, dass zumindest einige von ihnen zur Nitrifikation befähigt sind (Treusch *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2010). Obwohl viele bisher bekannte Archaeen autotroph wachsen, wird heute vermutet, dass einige auch organischen Kohlenstoff verstoffwechseln können und daher weitere noch unbekannte Funktionen im Boden einnehmen könnten (Jia & Conrad 2009, Wessen *et al.* 2010b).

Pilze (*Fungi*) sind eukaryotische meist mehrzellig wachsende Organismen, die eine hohe Vielfalt an Strukturen und Formen aufweisen. Ihre Hyphen durchziehen den Boden und

tragen dadurch zur Stabilisierung der Aggregatstrukturen bei (Tisdall & Oades 1982). Aufgrund ihrer Größe (2-100 µm) sind sie vor allem in den Zwischenräumen der Makroaggregate zu finden. Pilze spielen bei den Mineralisierungs- und Humifizierungsprozessen im Boden eine wichtige Rolle, da sie in der Lage sind hochmolekulare Strukturen aus dem Pflanzenmaterial, wie z. B. Lignin und Cellulose, abzubauen und dieses so anderen Mikroorganismen als Nahrungsquelle zugänglich zu machen. Viele Pilze können auch als Mykorrhiza in Symbiose mit Pflanzenwurzeln leben und so erheblich zur Nährstoffversorgung von unterschiedlichsten Pflanzen beitragen. Auch am Abbau von organischen Schadstoffen können Pilze beteiligt sein (Bending *et al.* 2002, Gadd 2007).

1.4 Organische Schadstoffe und ihr Schicksal im Boden

Zusätzlich zum von Pflanzen stammenden organischen Material wurden vom Menschen zahlreiche organische Schadstoffe beabsichtigt und unbeabsichtigt in viele Böden eingebracht. Solche Einträge können auf landwirtschaftliche Tätigkeit, industrielle Produktion oder der Verbrennung fossiler Brennstoffe zur Energiegewinnung zurückgeführt werden. Im Boden sind organische Schadstoffe im Prinzip den gleichen Prozessen ausgesetzt wie jedes andere organische Material, d. h. sie verteilen sich je nach ihren physikochemischen Eigenschaften auf die drei Bodenphasen (fest, flüssig, gasförmig). Ihr Verbleib im Boden wird dabei besonders durch Prozesse der Sorption, der Verlagerung und des Abbaus bestimmt. Dabei treten sie in Wechselwirkung mit biogeochemischen Grenzflächen der organo-mineralischen Aggregatstrukturen, die ihre Bioverfügbarkeit und ihren Abbau maßgeblich beeinflussen (Alexander 2000).

Bei der Sorption gehen die organischen Schadstoffe physikalische und chemische Bindungen mit den Tonmineralen und der organischen Substanz bzw. deren Oberflächen ein. Dieser Prozess hängt dabei stark vom chemischen Charakter der Verbindung, deren Wasserlöslichkeit, der Konzentration in der Bodenlösung und Art und Menge der Oberflächen, sowie pH-Wert und Temperatur ab. Die meisten organischen Schadstoffe treten in Wechselwirkung mit der organischen Bodensubstanz. Die Sorption verläuft dabei in zwei Phasen. Ein schneller, unmittelbar nach dem Eintrag der Verbindung beginnender Sorptionsprozess führt zu einer relativ stabilen Gleichgewichtsverteilung zwischen Bodenlösung und Festphase. In einem langsamer fortschreitenden Sorptionsprozess erfolgt durch Diffusionsprozesse und über kovalente Bindungen ein Einbau der Schadstoffe in Huminstoffmoleküle. Durch Bildung dieser gebundenen Rückstände (*bound residues*) nimmt die Extrahierbarkeit und Bioverfügbarkeit von organischen Schadstoffen langfristig stark ab, ohne dass diese zwangsläufig chemisch verändert werden (Gevao *et al.* 2000).

Ein Großteil der organischen Schadstoffe ist im Boden mikrobiologisch abbaubar (Wackett & Hershberger 2001). Der Abbau der meisten organischen Schadstoffe erfolgt dabei, indem Bakterien und/oder Pilze diese als Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Energiequelle nutzen bzw.

enzymatische Zufallsreaktionen („Cometabolismus“) ohne direkten Nutzen für die Organismen stattfinden. Die Persistenz und die Auswirkungen der Schadstoffe in der Umwelt werden daher häufig maßgeblich durch die mikrobielle Biodegradation bestimmt. Art und Ausmaß des Abbaus werden dabei erheblich durch die Lebensbedingungen für die Mikroorganismen und damit durch Umweltbedingungen wie Temperatur, Feuchte, pH und Substratangebot beeinflusst (Providenti *et al.* 1993). Da die am Schadstoffabbau beteiligten Mikroorganismen jedoch nicht gleichmäßig im Boden verteilt sind, sondern unterschiedliche Mikrokompartimente besiedeln können, spielt ihre räumliche Verteilung an und in diesen Mikrokompartimenten vermutlich eine entscheidende Rolle.

1.5 Bedeutung der organischen Substanz in Böden

Die Bedeutung der organischen Substanz bzw. des organischen Kohlenstoffs (C_{org}) für die Funktion und Belastbarkeit von Böden wurde vor geraumer Zeit erkannt und wird daher unter anderem mit Hilfe von Dauerfeldversuchen detailliert untersucht (Körschens & Pfefferkorn 1998). Eine Veränderung des C_{org} -Gehalts, wie er durch landwirtschaftliche Nutzung verursacht werden kann, kann große Auswirkungen auf die Bodenstruktur und die Bodenfunktionen haben. Eine Abnahme der organischen Bodensubstanz kann z. B. zu einer verstärkten Erosion von Böden führen, da die Gefüge- und die Aggregatstabilität durch den Verlust an Kohlenstoff und Mikroorganismen verringert wird (Barthés & Roose 2002). Eine Reihe von Untersuchungen zeigte zudem, dass die Bodenfruchtbarkeit seit Anfang des Jahrhunderts durch den Austrag des organischen Kohlenstoffs in Folge von Bewirtschaftungsmaßnahmen wie Pflügen und intensivem Pflanzenanbau kontinuierlich abnahm (Gupta & Germida 1988, Van Veen & Kuikman 1990). Durch die Ernte verringert sich typischerweise das für die Bodenorganismen verfügbare Pflanzenmaterial und somit die Verfügbarkeit von Nährstoffen und Humus, was wiederum zu einem rückläufigen Pflanzenertrag führt. Die Düngung solcher Böden mit mineralischen und organischen Stoffen kann die „natürliche“ Humus- und Nährstoffbildung nicht vollständig ersetzen, so dass sich für einen dauerhaften Erhalt der Bodenfruchtbarkeit und der organischen Substanz alternative Bewirtschaftungsformen empfehlen. Einem Verlust an Nährstoffen wird zum Beispiel durch unterschiedliche Fruchtfolgen unter Einbindung von Leguminosen entgegengewirkt.

Zahlreiche Studien belegen, dass es ein enges Zusammenspiel zwischen dem C_{org} -Gehalt und den Größen der organo-mineralischen Fraktionen von Böden gibt, wobei besonders feinere Partikel reich an Kohlenstoff sind (Schulten *et al.* 1993, Stemmer *et al.* 1998, Christensen 2001). Die Tonfraktion kann dabei zwischen 50 bis 75 % des gesamten C_{org} im Boden enthalten, während im Allgemeinen die Gehalte in Schlufffraktionen mit 20 bis 40 % und Sandfraktionen mit < 10 % geringer ausfallen (Christensen 1992, 2001). Dazu kommen qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der mit den Mineralpartikeln assoziierten organischen Bodensubstanz. Während in gröberen Fraktionen vor allem leichter abbaubare primäre Pflanzenreste und Substrate vorliegen, wird in den Aggregaten < 20 μm

überwiegend stärker zersetztes Material gefunden (Oades & Waters 1991, Guggenberger *et al.* 1994). So konnte z. B. beobachtet werden, dass der Anteil an Lignin- und Polysacchariden in feineren Korngrößenfraktionen abnahm, der Anteil ihrer Oxidationsprodukte dagegen anstieg (Chefetz *et al.* 2002). Diese räumlichen Unterschiede können sich daher entscheidend auf die Verfügbarkeit des C_{org} für Mikroorganismen auswirken (Golchin *et al.* 1995). Dies wird durch zahlreiche Studien belegt, die zeigen, dass sich die Umsatzrate der organischen Bodensubstanz zwischen den Korngrößenfraktionen unterscheidet (Gregorich *et al.* 1989, Buyanovsky *et al.* 1994, Stemmer *et al.* 1998). Diese heterogene räumliche Verteilung der organischen Substanz, trifft vermutlich auch auf die mikrobielle Biomasse, die mit der organischen Substanz korreliert, und damit auf die mikrobielle Aktivität zu. Sie ist daher eine wichtige Vorhersagegröße zur quantitativen Beschreibung von Stoffkreisläufen und Stabilisierungsprozessen in Böden (Ladd *et al.* 1993).

1.6 Bedeutung der Korngröße für die Verteilung von Mikroorganismen und für die Sorption organischer Schadstoffe

Über die genaue Abundanz und Diversität von Mikroorganismen in Aggregaten und unterschiedlichen Korngrößenfraktionen ist nur wenig bekannt. Untersuchungen über die Verteilung von Mikroorganismen in den Mikrokompartimenten weisen jedoch darauf hin, dass ihr Vorkommen stark von der Korngröße beeinflusst wird. Äußere Faktoren, wie die Düngung, scheinen dagegen eine geringere Rolle zu spielen (Sessitsch *et al.* 2001, Poll *et al.* 2003, Väisänen *et al.* 2005). Die höchsten Zellzahlen und mikrobielle Biomasse wurden vorwiegend an der Schluff- und Tonfraktion gefunden (Kanazawa & Filip 1986, Monrozier *et al.* 1991, Lensi *et al.* 1995, Singh & Singh 1995, Chotte *et al.* 1998). In einer Arbeit (Van Gestel *et al.* 1996) konnte die Menge an mikrobiell gebundenem Biomasse-C eines landwirtschaftlich genutzten Lehm Bodens vollständig ($R^2=0,99$) durch den Tongehalt und die organische Substanz der Korngrößenfraktionen erklärt werden. Für indirekte Schätzungen der Größe und Aktivität von Mikroorganismen in Korngrößenfraktionen wurden häufig die Verteilung von ATP (Ahmed & Oades 1984) oder Bodenenzymen (Kandeler *et al.* 2000) analysiert. Die höchsten ATP-Gehalte wurden dabei abhängig vom untersuchten Boden entweder in der Schluff- oder in der Tonfraktion gefunden. Im Gegensatz dazu verteilten sich unterschiedliche Enzyme nicht einheitlich auf bestimmte Korngrößenfraktionen. Analysen zur mikrobiellen Diversität in Abhängigkeit von Korngrößenfraktionen anhand von genetischen Fingerabdruckprofilen wiesen auf unterschiedlich strukturierte und angepasste Bakteriengemeinschaften an den jeweiligen Fraktionen hin (Kandeler *et al.* 2000, Poll *et al.* 2003). Daraus wurde gefolgert, dass die Mikroorganismen-Gemeinschaften an den jeweiligen Partikelgrößenfraktionen relativ inert gegenüber äußeren Einflüssen sind (Sessitsch *et al.* 2001). Die Verteilung der Bakterien, Archaeen oder Pilze in Abhängigkeit der verschiedenen Korngrößenfraktionen wurde bisher nicht im Detail untersucht. Es gibt jedoch zahlreiche Studien die belegen, dass Bakterien und Pilze unterschiedliche Lebensräume im Boden einnehmen. Dies konnte z. B. durch Bestimmung von Biomasse und Zellzahlen dieser beiden Gruppen (Guggenberger *et al.*

1999) und über Phospholipid-Fettsäure (PLFA)-Analysen (Kandeler *et al.* 2000) gezeigt werden. Beide Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die Pilze in erster Linie in Makroaggregaten zu finden sind, während die Bakterien die Mikroaggregate als Habitat bevorzugen. Dies spiegelt auch ihre Rolle bei der Bildung dieser Aggregatstrukturen wider (Oades 1993, Degens 1997).

Die Korngrößenfraktionen haben auch einen deutlichen Einfluss auf die Verteilung organischer Schadstoffe, die sich häufig vor allem in den feineren Fraktionen wiederfinden (Amellal *et al.* 2001, Krauss & Wilcke 2002). Erklärungen dafür könnten der Schutz vor einem Abbau in den Mikroaggregaten, die Verfügbarkeit einer größeren spezifischen Oberfläche für die Sorption, eine hohe lokale Nano-Porosität zur Sequestrierung oder der hohe Gehalt an hydrophober organischer Bodensubstanz darstellen (Xing & Pignatello 1996, Chung & Alexander 1998, 2002). In den meisten Fällen konnte die Sorption organischer Schadstoffe an Korngrößenfraktionen direkt auf den hohen Gehalt an organischer Substanz zurückgeführt werden (z. B. Uyttenbroek *et al.* 2006).

1.7 Untersuchungen des komplexen Bodensystems

Aufgrund der heterogenen Bodenstruktur stellt es eine große Herausforderung dar, die im Boden ablaufenden physikalischen, chemischen und biologischen Prozesse *in situ* zu erfassen und in Bezug zu Bodenfunktionen zu setzen. Vor allem über die Vorgänge an biogeochemischen „Grenzflächen“, also dem Übergangsbereich zwischen den unbelebten und belebten Bodenbestandteilen, ist nur wenig bekannt. Aus diesem Grund hat sich die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) dieser Thematik in dem Schwerpunktprogramm „Biogeochemische Grenzflächen in Böden“ (SPP 1315) angenommen. Ziel dieses Programms ist es, biogeochemische Grenzflächen des Bodens strukturell und funktionell zu charakterisieren, um neue Einblicke zu gewinnen, wie sie das Schicksal und die Wirkungsweise von organischen Schadstoffen im Boden beeinflussen können (Totsche *et al.* 2010). Um grundsätzliche Mechanismen ableiten und Vorhersagen treffen zu können, wurden dafür in einer Reihe von Teilprojekten mit unterschiedlichen Schwerpunkten verschiedene Grenzflächen und ihre Bestandteile untersucht. Der Fokus dieser Arbeit, die als Teil dieses Schwerpunktprogramms stattfand, sollte dazu beitragen, die Bedeutung der organischen Substanz und der Korngrößenfraktionen für die biologischen und chemischen Prozesse im Boden, die zu einem Abbau von organischen Schadstoffen führen, genauer zu analysieren und die mikrobielle Vielfalt zu charakterisieren.

1.8 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der organischen Bodensubstanz auf die Mikroorganismen-Gemeinschaften und deren Wechselwirkung beim Abbau von zwei ausgewählten organischen Schadstoffen, Phenol und 2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP), in Böden und Mikrokompartimenten zu charakterisieren. Durch die getrennte und gemeinsame Charakterisierung der Bodenbestandteile, in diesem Fall ihrer Korngrößenfraktionen (Abb. 2), sollten neue Erkenntnisse eines unterschiedlichen Gehalts an organischer Bodensubstanz auf die Verteilung organischer Schadstoffe, sowie der mikrobiellen Gemeinschaften in landwirtschaftlichen Böden und deren Abbaupotenzial von organischen Schadstoffen gewonnen werden.

Die Untersuchungen sollten an drei Bodenvarianten einer Löss-Schwarzerde, die seit über 100 Jahren einer kontinuierlichen, aber unterschiedlichen Düngungspraxis unterworfen waren, realisiert werden. Vorhergehende Untersuchungen hatten gezeigt, dass die unterschiedlichen Langzeitdüngungen zu verschiedenen großen, stabilen C_{org} -Gehalten in den Varianten geführt hatten (Leinweber *et al.* 1995, Körschens *et al.* 2002, Blair *et al.* 2006). Somit lagen für die Untersuchungen Bodenvarianten mit einer gleichen Pedogenese, einer sehr ähnlichen Geschichte und ähnlichen Eigenschaften vor, die sich jedoch im Gehalt an organischem Kohlenstoff unterschieden. Damit erschienen diese geeignet, die Bedeutung dieses Faktors in vergleichenden Untersuchungen zu ermitteln.

Da die Bodenmikroorganismen im Wesentlichen auf den unterschiedlich beschaffenen Oberflächen von Bodenbestandteilen leben und daher nicht homogen in der Bodenmatrix verteilt sind, lag ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit auf der Analyse von Mikrokompartimenten. Die heterogene Bodenstruktur sollte in dieser Arbeit durch Korngrößenfraktionierung der Bodenvarianten erreicht werden, da diese Zugang zu unterschiedlich beschaffenen organo-mineralischen Komplexen ermöglicht. Diese Komplexe treten als Bestandteile der Boden-Aggregate nicht nur mit den Mikroorganismen sondern auch mit möglicherweise anwesenden organischen Schadstoffen in Wechselwirkungen. Damit stellen die organo-mineralischen Bodenoberflächen eine Grenzfläche zwischen der Biosphäre und der wässrigen Phase des Bodens, der Bodenlösung, dar.

Zur Auftrennung der Böden in die unterschiedlichen Partikelgrößen (Sand, Schluff, Ton) sollte im Rahmen dieser Untersuchungen eine von der DFG vorgeschlagene Fraktionierungstechnik angewendet werden. Zur Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaften auf DNA-Ebene war dazu jedoch eine Anpassung der Methode erforderlich. Um den Einfluss der organischen Bodensubstanz auf die in den Böden vorliegenden Mikroorganismen-Gemeinschaften bewerten zu können, sollten nämlich die Populationsgrößen und die Diversität wichtiger mikrobieller Gruppen (*Bacteria*, *Archaea*, *Fungi*) über kultivierungsunabhängige molekularbiologische Methoden, d. h. durch qPCR und T-RFLP, in den Böden und Mikrokompartimenten erfasst werden. Das Schicksal von organischen Schadstoffen in den Böden sollte anhand zweier repräsentativer, umweltrelevanter mikrobiell abbaubarer Modellsubstanzen, Phenol und 2,4-DCP, untersucht werden. Beide Verbindungen ähneln sich in ihrer Struktur, unterscheiden sich jedoch in ihrer Wasserlöslichkeit, wodurch diese als zusätzliche Einflussgröße mit

berücksichtigt werden kann. Zunächst sollte das konzentrationsabhängige Sorptionsverhalten der beiden Schadstoffe und ihre Verteilung auf die Korngrößenfraktionen der unterschiedlichen Bodenvarianten mit Hilfe von ^{14}C -markierten Verbindungen ermittelt werden. Der mikrobielle Abbau sollte nachfolgend in Inkubationsexperimenten mit den ^{14}C -markierten Substanzen über deren $^{14}\text{CO}_2$ -Mineralisierungsrate verfolgt werden. Anhand der Abbaukurven aus diesen Versuchen sollten im Anschluss Versuche mit ^{13}C -Markierung unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden, um die am Abbau beteiligten Mikroorganismen über molekularbiologische Techniken, insbesondere dem *stable isotope probing* (SIP), zu charakterisieren. Phylogenetische Analysen sollten eine genauere Zuordnung dieser Mikroorganismen ermöglichen, um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Abhängigkeit von der organischen Bodensubstanz herauszustellen.

Die räumliche Verteilung der am Abbau beteiligten Mikroorganismen-Gemeinschaften auf die Mikrokompartimente (Korngrößenfraktionen) sollte beispielhaft anhand des Phenols untersucht werden. Durch eine gemeinsame Betrachtung der Ergebnisse der durchgeführten biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen von Mikroorganismen und Schadstoffen sowie ihrem Zusammenwirken beim Abbau sollten schließlich generelle Rückschlüsse über die Bedeutung der organischen Bodensubstanz und der verschiedenen Mikrokompartimente für diese ökologisch wichtigen Prozesse gezogen werden.

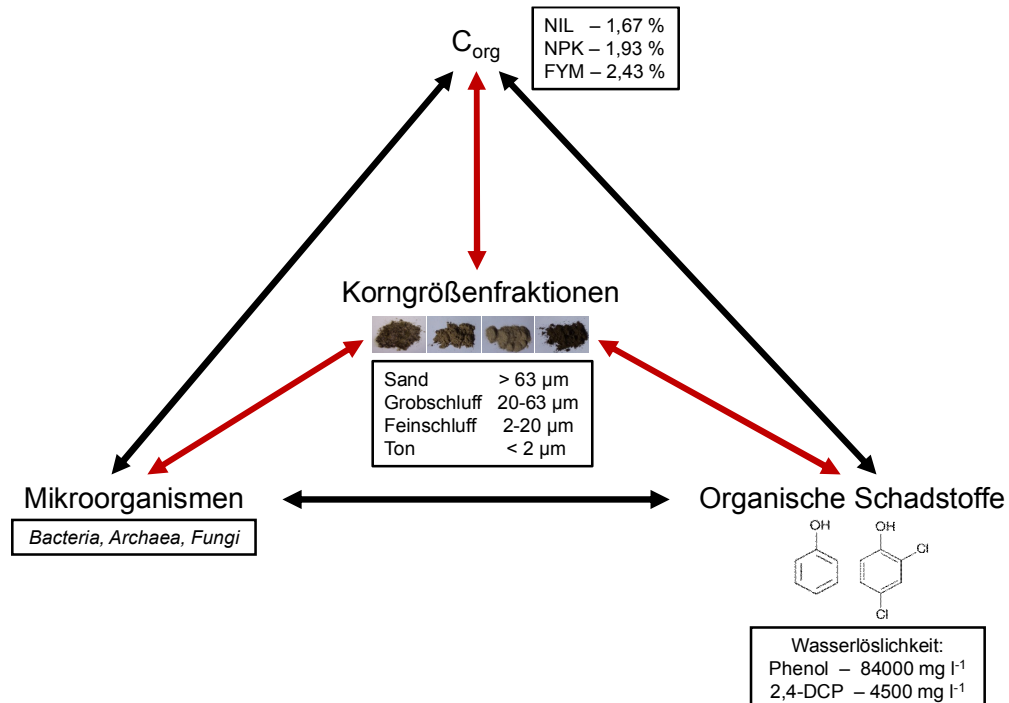


Abb. 2 Schematische Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Bodenbestandteile. Die Pfeile zeigen (potenzielle) Wechselwirkungen.

1.9 Auswahl der Böden

Um die Bedeutung der organischen Substanz untersuchen zu können, war es erforderlich, Bodenvarianten zu verwenden, die sich in ihren Eigenschaften weitgehend ähnelten, aber in ihren C_{org} -Gehalten unterschieden. Die Löss-Schwarzerde des Statischen Düngungsversuches Bad Lauchstädt erfüllte diese Kriterien. In den Bodenvarianten der Versuchsfelder von Bad Lauchstädt hatten sich aufgrund unterschiedlicher Düngungen, die seit 1902 kontinuierlich durchgeführt werden, spezifische unterschiedliche C_{org} -Gehalte eingestellt. Grundlegende Bodenparameter, wie z. B. die Korngrößenverteilung, stimmten zwischen diesen trotz unterschiedlicher Behandlung in großem Maße überein (Körschens *et al.* 2002). Für die eigenen Untersuchungen wurden drei Bodenvarianten (NIL, NPK, FYM) ausgewählt und verglichen (Details bei 2.2.1).

1.10 Auswahl der Schadstoffe

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Wasserlöslichkeit einer organischen Verbindung einen großen Einfluss auf ihre Verteilung in bestimmte Bodenmikrokompartimente hat und außerdem die Verfügbarkeit für den mikrobiellen Abbau beeinflusst. Da die Mikroorganismen nicht gleichmäßig im heterogenen Boden verteilt sind, sondern in verschiedenen Habitaten und unterschiedlichen Mikrokompartimenten koexistieren, wurde angenommen, dass abhängig von den Eigenschaften der organischen Verbindung, unterschiedliche Mikroorganismen an den jeweiligen Korngrößenfraktionen mit einem Schadstoff in Wechselwirkung treten können. Eine Charakterisierung des Einflusses der chemischen Eigenschaften eines Schadstoffs auf seine Verteilung im Boden, sowie der Mikroorganismen-Gemeinschaften, die mit bestimmten Mikrokompartimenten assoziiert sind, sollte daher letztendlich zu einer besseren Vorhersage des Schicksals und der Wirkung eines organischen Schadstoffs im Boden führen. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurden deshalb die Schadstoffe Phenol und 2,4-DCP untersucht, die sich zwar strukturell aufgrund der Phenylgruppe ähneln, sich jedoch in ihrer Wasserlöslichkeit deutlich unterscheiden (Tab. 1).

Tab. 1 Physikalisch-chemische Eigenschaften von Phenol und 2,4-DCP (aus IFA GESTIS-Stoffdatenbank, <http://www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank>).

	Phenol	2,4-DCP
Schmelzpunkt (°C)	41	40-43
Siedepunkt (°C)	182	209-211
Molare Masse (g mol ⁻¹)	94,11	163
Wasserlöslichkeit (g l ⁻¹)	84	4,5
log K _{ow}	1,5	3,17
pK _s	9,99	7,97

Phenol ist ein weißer kristalliner Feststoff, der in der Natur als Abbauprodukt von organischem Material vorkommt, und ein Bestandteil von Steinkohleteer und Erdöl. Der größte Anteil des Phenols in der Biosphäre ist jedoch nicht natürlichen Ursprungs sondern anthropogen. Phenol-Freisetzung erfolgt durch Industrieabfälle, aber auch durch Abgase, Zigarettenrauch, Lösungsmittel, Desinfektionsmittel oder Klebstoffe. Der größte Phenolanteil wird dabei in die Luft emittiert. Von dort kann es jedoch durch Auswaschung (Regen) in das Wasser und den Boden gelangen. Auch Havarien und Unfälle mit Kraftstofftransporten können zu einem Eintrag von Phenol in den Boden führen, wo es durch chemische Reaktionen und Mikroorganismen abgebaut werden kann (Agarry *et al.* 2008). Da Phenol bereits bei niedrigen Konzentrationen toxisch auf Zellen wirkt (Kahru *et al.* 2002) und dadurch die Gesundheit von Mensch und Tier gefährdet (Calabrese & Kenyon 1991), ist es erforderlich, Phenol aus kontaminierten Böden zu entfernen. Eine zunehmende Rolle spielt dabei die Bioremediation, bei der Mikroorganismen gezielt eingesetzt werden, um den Phenol-Abbau zu beschleunigen (Agarry *et al.* 2008).

2,4-DCP ist ein farbloser nadelförmige Kristalle ausbildender Feststoff. Chlorphenole, wie 2,4-DCP, sind synthetische organische Verbindungen, die von der Industrie in großem Maßstab hergestellt werden und unter anderem als Holzschutzmittel, Herbizide, Fungizide und als Zwischenprodukte in der Arzneimittel- und Farbstoffsynthese Verwendung finden. 2,4-DCP wird als Zwischenprodukt bei der Herstellung des Herbizids Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) eingesetzt und stellt gleichzeitig in der Natur dessen erstes Abbauprodukt dar (Perkins *et al.* 1990). Zudem findet 2,4-DCP Verwendung als Mottenschutz- und Desinfektionsmittel. Die industrielle Verwendung und ihre Entstehung beim Abbau von Herbiziden führten in vielen Böden weltweit zu einer Akkumulation von Dichlorphenolen. Aufgrund ihrer kanzerogenen und mutagenen Wirkungen, sowie ihrer Umweltpersistenz, sind Dichlorphenole daher von hoher ökologischer Bedeutung (Czaplicka 2004). Dies betrifft insbesondere auch das 2,4-DCP, das stabiler und toxischer als seine Ausgangssubstanz 2,4-D ist und sich daher in Böden mit hohen Zugaben des Herbizids anreichern kann (Short *et al.* 1991). Aufgrund ihrer nachteiligen Auswirkungen auf die Umwelt wurde die Produktion und Verwendung dieser Herbizide in vielen Ländern stark eingeschränkt oder ganz verboten. Abbauuntersuchungen zeigten, dass die Mehrzahl der Chlorphenole gegenüber einem aeroben mikrobiellen Abbau resistent ist (Copley 1997). Dies gilt jedoch nicht für das 2,4-DCP, dass sowohl anaerob als auch aerob abgebaut werden kann (Ahel *et al.* 1994). Während der 2,4-DCP-Abbau durch Reinkulturen gut charakterisiert ist, gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit dem *in situ* Prozess und der Ermittlung von am Abbau beteiligten Mikroorganismen befassen (Lillis *et al.* 2009, 2010).

1.11 Isolierung von Boden-Mikrokompartimenten durch Korngrößenfraktionierung

Um einen differenzierten Einblick in die Verteilung, Umsatzrate und chemische Zusammensetzung der organischen Substanz im Boden zu erhalten, hat sich die physikalische Auftrennung in unterschiedliche Korngrößenfraktionen als eine geeignete

Methode erwiesen. Zur Auftrennung der organo-mineralischen Komplexe werden dabei die physikalischen Eigenschaften der Partikel, ihre Größe und Dichte, ausgenutzt. Nach dem Sieben einer Bodenprobe (< 2 mm) um größeres Pflanzenmaterial auszuschließen, besteht der erste Separierungsschritt darin, Makroaggregate durch das Lösen im Wasser zu zerstören und wasserstabile Mikroaggregate zu erhalten. Eine übliche Methode hierfür ist die Ultraschallbehandlung mit geringem Energieeintrag. Neben Fraktionierungstechniken in Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Dichte, wurden im Anschluss häufig Feuchtsiebe-, Zentrifugations- und Sedimentationsschritte zur Gewinnung unterschiedlicher Korngrößenfraktionen angewendet (Monrozier *et al.* 1991, Stemmer *et al.* 1998, Amelung *et al.* 1999, Puget *et al.* 2000). Auch für die nachfolgende molekularbiologische Untersuchung von Mikroorganismen in Korngrößenfraktionen ist eine Dispergierung der Aggregate mit Ultraschall geeignet (Sessitsch *et al.* 2001, Poll *et al.* 2003). Die optimale Dauer der Behandlung und die notwendige Energie für eine komplette Dispergierung variiert jedoch von Bodenart zu Bodenart, so dass die Methodik entsprechend an den Versuch angepasst werden muss (Christensen 1992).

1.12 Molekulargenetische Analyse von rRNA-Genen

Nur ein geringer Prozentsatz der Mikroorganismen im Boden lässt sich durch Kultivierung erfassen (Rappé & Giovannoni 2003). Die große Mehrheit ist dagegen, vermutlich aufgrund von komplexen Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung und untereinander, nicht mit herkömmlichen Nährmedien und Inkubationsbedingungen kultivierbar. Um einen Einblick in die Zusammensetzung und Variabilität der Mikroorganismen-Gemeinschaften im Boden zu erhalten, ist eine molekulare Charakterisierung über Analysen von direkt extrahierter Boden-DNA deutlich aussagekräftiger. Kultivierungsunabhängige Methoden, die auf einer PCR-Amplifikation ribosomaler RNA (rRNA) oder ihrer Gene basieren, gewähren Zugang zu den Bodenmikroorganismen, unabhängig von ihrer Kultivierbarkeit. Die phylogenetische Analyse ihrer sequenzierten PCR-Produkte erlaubt eine verwandtschaftliche Zuordnung zu bekannten kultivierbaren Vertretern mit Hilfe von DNA-Sequenzvergleichen aus Datenbanken (Tebbe & Schlöter 2006). Zur Betrachtung der Diversität von dominanten Bodenmikroorganismen können Bibliotheken mit Hilfe von Klonierungen in das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) oder genetische Profile („Fingerprints“) hergestellt werden. Beide methodischen Ansätze basieren auf der Analyse von PCR-Produkten, die mit entsprechenden Primersystemen aus Boden-DNA vervielfältigt wurden. Zu den Fingerprinting-Methoden gehören z. B. die DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), T-RFLP (*terminal restriction fragment lengths polymorphism*) oder SSCP (*single strand conformation polymorphism*) (Muyzer *et al.* 1993, Liu *et al.* 1997, Schwieger & Tebbe 1998).

DNA kann nicht nur direkt aus Böden sondern auch aus deren Korngrößenfraktionen extrahiert werden (Ranjard *et al.* 1998, 2000, Sessitsch *et al.* 2001, Väisänen *et al.* 2005). Daher lässt sich potenziell die gesamte Mikroorganismen-Gemeinschaft eines Bodens in mikrobiologisch bedeutsamere Einheiten zerlegen, wodurch Zugang zu den verschiedenen

Funktionseinheiten gewonnen werden kann. Trotz des Fortschritts bei der Anwendung von molekularen Methoden ist die Vielfalt der Mikroorganismen jedoch immer noch viel zu groß, um allein durch genetische Profile dargestellt zu werden (Smalla *et al.* 2007). Tatsächlich weist eine jüngere Studie darauf hin, dass ein Gramm Ackerboden mehr als 1.000.000 Bakterienarten beherbergen könnte (Gans *et al.* 2005), was die Daten aus vorherigen Studien, die von 4.000 (Torsvik *et al.* 1990) bis 64.000 (Curtis *et al.* 2002) Arten reichten, um ein Vielfaches übersteigen würde. Auch sind bei dieser Schätzung die im Boden ebenfalls vorliegenden Archaeen und Pilze noch nicht berücksichtigt.

Zusätzlich zu genetischen Profilen oder alternativ zu rRNA-Gen-Klon-Bibliotheken kann die Aussagekraft von kultivierungsunabhängigen Analysen von Mikroorganismen-Gemeinschaften durch quantitative PCR (qPCR) erweitert werden, mit deren Hilfe man die Größe mikrobieller Populationen bestimmen kann (Buckley & Schmidt 2003, Ochsenreiter *et al.* 2003). Auch das *stable isotope probing* (SIP) basiert auf der Analyse von Nukleinsäuren. Diese Methode erlaubt durch Einbau von ^{13}C aus markierten Verbindungen in ihre Nukleinsäuren die Anreicherung und Identifizierung von Mikroorganismen, die Kohlenstoffquellen verstoffwechseln. Schwere Nukleinsäuren mit ^{13}C können dabei von nicht markierten durch Zentrifugation in einem Dichtegradienten getrennt werden (Radajewski *et al.* 2000, Manefield *et al.* 2002). Die Diversität der Mikroorganismen mit schweren Nukleinsäuren wird dann über PCR-Amplifikation von rRNA-Genen bzw. RT-PCR Amplifikation von rRNA identifiziert (Borodina *et al.* 2005, Gallagher *et al.* 2005, Singleton *et al.* 2005).

Die Anwendung von unterschiedlichen molekularen Nukleinsäure-basierenden Methoden weist insgesamt besonders in Kombination ein bisher noch wenig genutztes Potenzial auf, um mikrobiologische Prozesse, die im Boden und unterschiedlichen Boden-Mikrokompartimenten ablaufen, zu charakterisieren. Daher wurden in dieser Arbeit die Wechselwirkungen zwischen organischem Kohlenstoff, Bodenkorngrößenfraktionen, organischen Schadstoffen und Mikroorganismen-Gemeinschaften komplementär mit der T-RFLP-Technik, der qPCR und der SIP-Technik untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Die radioaktiven Substanzen wurden von der Firma GE Healthcare (Chalfont St Giles, Großbritannien) bezogen. Direkt nach dem Erhalt wurden sie jeweils in 1 bis 1,5 ml 96 % Ethanol gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Radioaktivität dieser Lösungen betrug 3,25 MBq ml⁻¹ für das ¹⁴C-Phenol und 3,85 MBq ml⁻¹ für das ¹⁴C-2,4-DCP.

Das ¹³C-Phenol wurde von der Firma IsoSciences (King of Prussia, Pennsylvania), das ¹³C-2,4-DCP von der Firma Campro-Scientific (Veenendaal, Niederlande) synthetisiert. Nach der Lieferung wurden die Substanzen bis zur Verwendung bei 4 bis 8 °C gelagert.

2.1.2 Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

0,8 % - 2 % Agarosegel

Agarose	0,8 - 2,0 g
1x TBE-Puffer	100 ml
Ethidiumbromid (1 %)	3 µl

Bind Silane-Lösung

Ethanol (96 %)	25 ml
Essigsäure	250 µl
PlusOne® Bind-Silane	250 µl

„Crush and Soak“-Puffer

Ammoniumacetat	0,5 M
Magnesiumacetat	0,01 M
Na ₂ EDTA (pH 8,0)	1 mM
SDS	0,1 % (w/v)

CsCl-Lösung

CsCl	250 g
Bidestilliertes Wasser	150 ml

DNA-Ladepuffer für Agarosegele

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)
Glycerin	30 % (v/v)

DNA-Ladepuffer für SSCP-Gele

Formamid (95 %)	950 µl
NaOH-Lösung (1M)	10 µl
Bromphenolblau	0,025 % (w/v)

Entwicklerlösung

Na ₂ CO ₃ · 10 H ₂ O	33,75 g
Formaldehyd 37 %	1,2 ml
Na ₂ S ₂ O ₃ 0,2 %	0,6 ml
Destilliertes Wasser	600 ml

Färbelösung

Silbernitrat	0,5 g
Formaldehyd 37 %	0,75 ml
Destilliertes Wasser	500 ml

Gradientenpuffer

Tris-HCl (pH 8,0)	0,1 M
KCl	0,1 M
Na ₂ EDTA (pH 8,0)	1 mM

IPTG-Lösung (0,1 M)

IPTG	0,238 g
------	---------

mit 10 ml bidestilliertem Wasser auffüllen, sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern

Lysispuffer

NaOH	0,2 M
SDS	0,25 % (w/v)

Polyethylenglykol-Lösung

NaCl	1,6 M
Polyethylenglykol 6000	30 % (w/v)

1x TE-Puffer

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
Na ₂ EDTA (pH 8,0)	1 mM

10x TBE-Puffer

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
Na ₂ EDTA (pH 8,0)	2 mM

1x TBE-Puffer

10x TBE-Puffer	100 ml
----------------	--------

Mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen

X-Gal-Lösung (0,1 M)

X-Gal 80 mg
in 2 ml N,N-Dimethylformamid lösen, bei -20 °C lagern

2.1.3 MedienLB -Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Ampicillin (50 mg ml ⁻¹)	2 ml

Feste Bestandteile in bidestilliertem Wasser lösen, mit NaOH pH auf 7,0 einstellen, auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren, auf 50 °C abkühlen lassen; danach Zugabe des Ampicillins

LAXI-Agar

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
IPTG-Lösung (0,1 M)	5 ml
X-Gal-Lösung (0,1 M)	2 ml
Ampicillin (50 mg ml ⁻¹)	2 ml

Feste Bestandteile in bidestilliertem Wasser lösen, mit NaOH pH auf 7,0 einstellen, auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren, auf 50 °C abkühlen lassen; danach Zugabe der Lösungen

SOC-Medium für die Transformation

Trypton	2 g	2 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 g	0,5 % (w/v)
NaCl-Lösung (1 M)	1 ml	10 mM
KCl-Lösung (1 M)	0,25 ml	2,5 mM
MgCl ₂ -Lösung (2 M)	1 ml	20 mM
Glukose-Lösung (2 M)	1 ml	20 mM

in bidestilliertem Wasser lösen, auf pH 7,0 einstellen, auf 100 ml auffüllen, sterilfiltrieren

2.1.4 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) oder Biomers.net (Ulm, Deutschland) synthetisiert. Die bei der SSCP-Methode verwendeten Rückwärtsprimer waren zusätzlich am 5'-Ende der DNA phosphoryliert. Eines der beiden bei der T-RFLP eingesetzten Primerpaare war jeweils am 5'-Ende der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert (vgl. Anhang Tab. 55).

2.1.5 Molekularbiologische Kits

Name	Firma	Bestellnummer
FastDNA® Spin Kit	MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA	116540600
FastDNA® SPIN Kit for Soil	MP Biomedicals	116560200
GENECLEAN® Turbo	MP Biomedicals	111102400
MinElute Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	28004
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	740609.50
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel	740588.50
pGEM®-T Vector Systems	Promega, Madison, Wisconsin, USA	A3610
PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit	MoBio, Carlsbad, Kalifornien, USA	12988-10
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28104

2.2 Probennahme und Physikalische Aufarbeitung

2.2.1 Probennahme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Bodenvarianten einer Löss-Schwarzerde untersucht. Diese stammten von einem Versuchsfeld des Statischen Düngungsversuchs Bad Lauchstädt bei Halle, der 1902 angelegt und seitdem kontinuierlich fortgeführt wurde (Körschens *et al.* 2002). Der Feldstandort befindet sich im Schwarzerdegebiet Sachsen-Anhalts und wird in einer Wechselfruchtfolge von Zuckerrübe, Kartoffeln, Winterweizen und Sommergerste bewirtschaftet. Weitere Standortcharakteristika sind in Tabelle 2 angegeben.

Tab. 2 Charakteristika des Standortes Bad Lauchstädt (Körschens *et al.* 2002).

Geografische Lage	51°24' nördliche Breite 11°53' östliche Länge
Bodenform (FAO-Klassifikation)	Löss-Schwarzerde (Haplic Chernozem) Lö1a1, Bodenwertzahl 94–98
Bodenart	Lehm
Höhenlage	113 m über NN
Grundwasserstand (29.03.94)	11,91 m
Jahresniederschlagsmittel (1896–1995)	483,8 mm
Mittlere Jahrestemperatur	8,7 °C
Mittlere Evapotranspiration (1996–2001)	527 mm

Für die eigenen Untersuchungen wurden drei Parzellen mit unterschiedlicher Langzeitdüngung (Details bei Körschens *et al.* 2002) beprobt:

1. NIL - keine Düngung
2. NPK - mineralische Düngung (mit Stickstoff (N), Phosphor, Kalium)
3. FYM - mineralische (NPK) und organische Düngung mit 20 t h⁻¹ Stalldung jedes 2. Jahr

Die Lage und die Größe der ausgewählten Parzellen sind in Abb. 3 dargestellt.

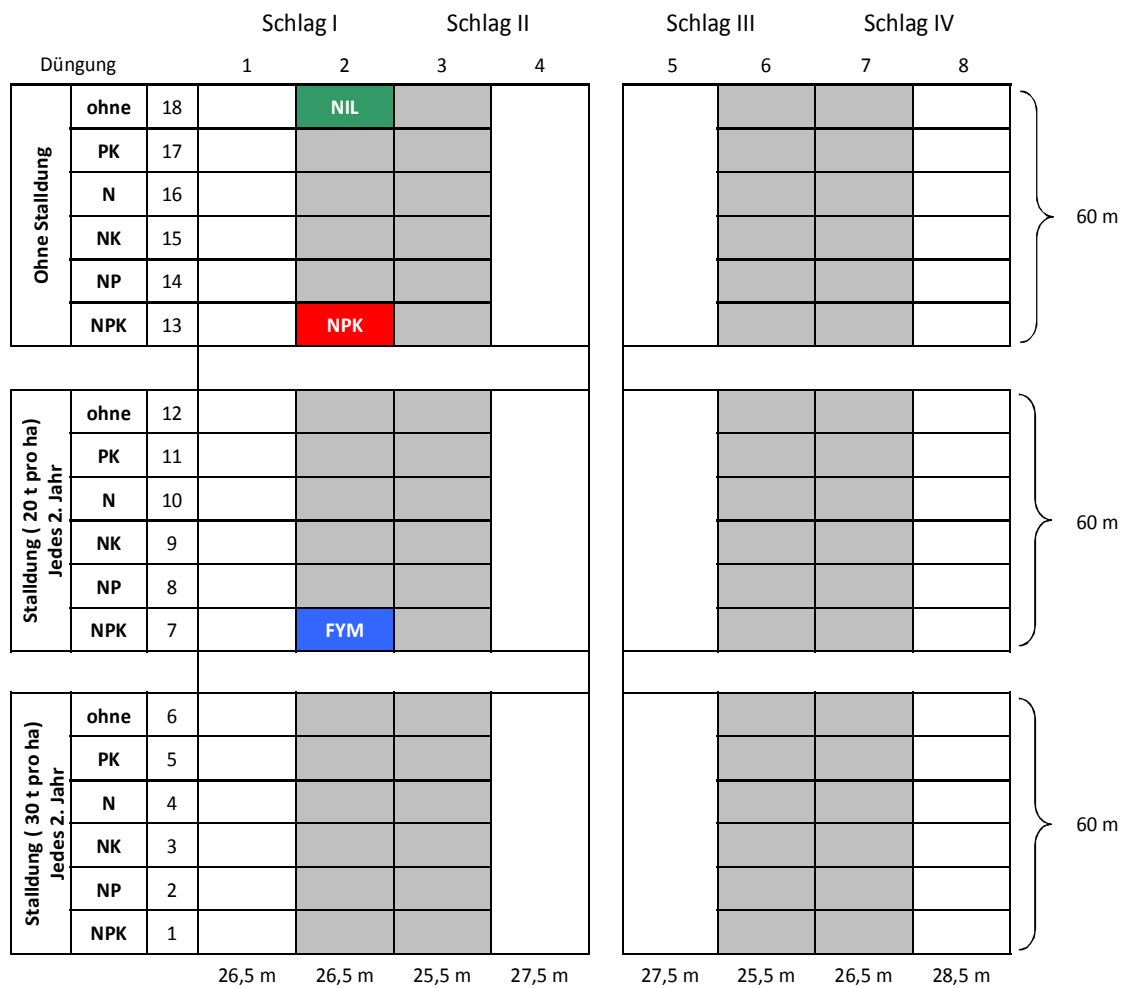


Abb. 3 Lageplan des Langzeitdüngungsversuchs Bad Lauchstädt (verändert nach Körschens *et al.* 2002). Die beprobten Parzellen sind hervorgehoben und mit NIL, NPK und FYM gekennzeichnet.

Die Probennahmen für die Untersuchungen dieser Arbeit erfolgten im April und Oktober 2008, 18 bzw. 24 Monate nach der letzten organischen Düngung. Für jede Bodenvariante wurden vier 5 m² Flächen (A, B, C, D) der Parzellen beprobt (Abb. 4).



Abb. 4 Abmessungen der Probennahmequadrate einer Versuchsparzelle.

Hierzu wurden je Quadrat 15 bis 20 Einstiche mit Bohrstöcken (Pürckhauer) mit einer Tiefe von 30 cm (Pflughorizont) vorgenommen, das Bodenmaterial (0 bis 30 cm) in Plastiktüten gesammelt und diese wurden mit einem Wattestopfen verschlossen. Nach der Probennahme wurde der Boden zur besseren Siebbarkeit im Labor leicht angetrocknet und

spätestens zwei Tage nach der Beprobung auf 2 mm gesiebt und in neue Tüten überführt. Die gesiebten Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt und am darauf folgenden Tag wurde die Bodenfeuchte bestimmt (2.2.2). Da die Böden nach beiden Probennahmen eine für die Versuche geeignete Feuchtigkeit von 40 bis 44 % der maximalen Wasserhaltekapazität (WHK_{max}) aufwiesen (Tab. 3), wurden sie ohne weitere Anfeuchtung bis zur weiteren Verwendung für maximal 24 (April-Böden) bzw. 72 Wochen (Oktober-Böden) bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Tab. 3 Bodenfeuchte der Bodenvarianten nach der Probennahme und bei 50 % der maximalen Wasserhaltekapazität.

Boden variante	Probenahme April 2008		Probenahme Oktober 2008		Vogt 2004	
	Bodenfeuchte (%)	% WHK_{max}	Bodenfeuchte (%)	% WHK_{max}	Bodenfeuchte (%)	% WHK_{max}
NIL	13,6 ± 0,2	44	12,9 ± 0,2	41	15,6	50
NPK	14,2 ± 0,4	44	12,8 ± 0,3	40	16	50
FYM	15,0 ± 0,8	43	14,4 ± 0,4	42	17,3	50

2.2.2 Bestimmung der Bodenfeuchte

Bevor die Böden in den jeweiligen Versuchen eingesetzt wurden, wurde die Bodenfeuchte bestimmt. Dabei konnte anhand des Messwerts auf die notwendige Einwaage für ein gewünschtes Trockengewicht (TG) geschlossen werden:

$$(1) \quad \text{Feuchtgewicht} = \frac{100 \cdot \text{gewünschtes Trockengewicht}}{(100 \% - \% \text{ Bodenfeuchte})}$$

Für die Messung wurden 5 bis 10 g einer Bodenprobe eingesetzt. Die Messung erfolgte mit einem elektronischen Feuchtigkeitsbestimmer MA 30 (Sartorius, Göttingen, Deutschland). In diesem wurden die Proben mit Infrarotstrahlung erwärmt, wodurch ihnen die Feuchtigkeit entzogen wurde. Durch Messung der Probenmasse vor und nach der Trocknung und Bildung der Differenz wurde dann automatisch der Feuchtigkeitsgehalt in % errechnet.

2.2.3 Fraktionierung in Korngrößen

Zur Auftrennung der Bodenvarianten in ihre unterschiedlichen Korngrößenfraktionen wurde eine auf Ultraschallbehandlung, Feuchtsiebung, Zentrifugation und Sedimentation basierende Methode eingesetzt. Die Korngrößenfraktionierung erfolgte dabei auf Grundlage eines von der DFG im Schwerpunktprogramm 1090 empfohlenen Protokolls, das auf den Protokollen von North (1976) und Amelung *et al.* (1998) basiert. Diese Methode wurde im Rahmen einer Doktorarbeit bereits erfolgreich für den hier zu Grunde liegenden Boden aus Bad Lauchstädt eingesetzt (Vogt 2004) und beinhaltet zwei Beschallungsschritte mit jeweils 60 und 440 J ml⁻¹. Für die eigenen Untersuchungen wurde die Methode durch Reduktion der Ultraschallbehandlung modifiziert (vgl. 3.2). Hierdurch sollten DNA- bzw. Biomasseverluste reduziert werden. Der erste Beschallungsschritt wurde auf 30 J ml⁻¹ herabgesetzt und der

zweite Beschallungsschritt entfiel ganz. Der zeitliche Ablauf der Fraktionierung, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurde, ist in Abbildung 5 dargestellt.

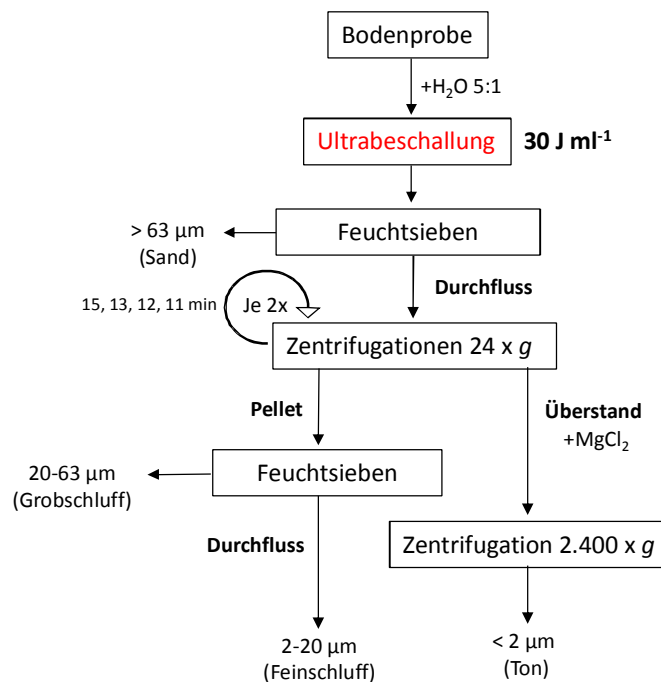


Abb. 5 Zeitlicher Ablauf der Bodenfraktionierung.

Für die Fraktionierung wurden je nach Experiment 10 oder 20 g Boden (TG) in einem Becherglas eingewogen und mit Wasser im Verhältnis 1 : 5 überschichtet. In dem Gefäß erfolgte unter stetiger Wasserkühlung die Ultraschallung mit 30 J ml⁻¹ mit einem Sonopuls UW 2200-Ultrasonicator (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland). Dies entsprach Beschallungszeiten von 21 s bei 10 g und 42 s bei 20 g Boden. Die Sondenspitze wurde dabei 10 bis 15 mm in die Flüssigkeit eingetaucht. Im Anschluss wurde die Suspension durch ein 63 µm Sieb gegeben und mit destilliertem Wasser gespült, um die Sandfraktion zu erhalten. Der Durchfluss wurde auf Zentrifugengläser verteilt und 15 min bei 400 U min⁻¹ (24 x g) bei Raumtemperatur in einer 4K10 Zentrifuge (Sigma, Osterode, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 3 l-Becherglas abdekantiert und das verbleibende Pellet in destilliertem Wasser resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zentrifugation wiederholt, der Überstand erneut abgegossen und das Pellet resuspendiert. Es folgten weitere sechs Zentrifugationen für jeweils zweimal 13, 12 und 11 min, bei denen wie zuvor vorgegangen wurde. Die Überstände enthielten dabei die Tonfraktion, während die Pellets aus den Schlufffraktionen bestanden. Nach der letzten Zentrifugation wurden die resuspendierten Pellets in den Zentrifugengläsern auf ein 20 µm Sieb gegeben. Der Boden auf dem Sieb wurde mit einem Gummispatel gewischt und dabei mit destilliertem Wasser gespült, bis der Durchfluss klar war. Das Becherglas mit dem Durchfluss (Feinschluff) wurde dann abgedeckt und bis zu einer möglichst vollständigen Sedimentation bei 4 bis 8 °C in einen Kühlschrank gestellt. Das 3 l-Becherglas mit dem Überstand aus den Zentrifugationen wurde mit 1 M MgCl₂-Lösung zu einer Endkonzentration von 3,3 mM versetzt, ebenfalls abgedeckt und zur Sedimentation in den Kühlschrank gestellt. Die Sand- und Grobschlufffraktionen wurden

auf den Sieben bei 40 °C in einem Trockenschrank über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurde der Überstand vorsichtig aus dem 3 l-Becherglas abgegossen. Das Sediment (Tonfraktion) wurde in destilliertem Wasser resuspendiert und in Zentrifugengläser überführt. Nach 10 min Zentrifugation bei 4.000 U min^{-1} ($2.400 \times g$) bei Raumtemperatur in einer 4K10 Zentrifuge wurde der Überstand abgegossen und das Pellet bei 40 °C über Nacht getrocknet. Nach der Sedimentation der Feinschluffpartikel des $> 20 \mu\text{m}$ -Durchflusses (nach zwei bis drei Tagen) wurde der Überstand ebenfalls abgegossen und das Sediment bei 40 °C über Nacht getrocknet. Nach dem Trocknen der vier Fraktionen erfolgte die Bestimmung der Trockengewichte. Die Sand- und Schlufffraktionen (> 63 , $20\text{-}63$ und $2\text{-}20 \mu\text{m}$) wurden bis zur weiteren Verwendung in kleine Gläschen überführt und bei Raumtemperatur gelagert. Die Tonfraktion ($< 2 \mu\text{m}$) wurde mit einer Mörsermühle Pulverisette 2 (Fritsch, Idar-Oberstein, Deutschland) zerkleinert und danach ebenfalls in ein Gläschen überführt und in diesem aufbewahrt.

2.3 Bestimmung von Bodeneigenschaften

2.3.1 pH-Wert-Messungen

Zur Überprüfung des pH-Werts in den Bodenvarianten wurden 10 g Boden in einem kleinen Becherglas mit 20 ml einer 0,01 M CaCl_2 -Lösung überschichtet und 30 min unter wiederholtem Rühren stehen gelassen. Nach weiteren 30 min zur Sedimentation des Bodens, wurde der pH-Wert im Überstand gemessen (Page 1982). Die Messung wurde mit einem pH-Meter HI 221 (HANNA Instruments, Kehl, Deutschland) durchgeführt.

2.3.2 Gesamtkohlenstoffgehalt

Die Gesamtkohlenstoffgehalte in den Böden und Fraktionen wurden durch Verbrennung in einem Elementaranalysator TruSpec® CN (Leco, St. Joseph, Michigan) bestimmt. Die Quantifizierung des entstehenden CO_2 erfolgt in diesem durch einen Infrarot-Detektor. Vor der Messung wurde ein Teil der Bodenproben bzw. der Bodenfraktionen getrocknet und mit einem Mörser fein gemahlen. Nachfolgend wurden von jeder Probe dreimal 0,18 g (Tonfraktionen: 0,1 g) eingewogen und verbrannt. Die Messwerte der drei Parallelen wurden gemittelt und auf die Einwaage bezogen.

2.3.3 Gesamt CO_2 -C

Im Rahmen der beabsichtigten Abbauntersuchungen mit Phenol und 2,4-DCP war die Menge des in 2 N Natronlauge aufgefangenen CO_2 zu bestimmen. Dazu wurden 1 bis 3 ml der Lauge in 60 ml Medizinflaschen mit einem gasdichten Drehverschluss mit Silikonseptum gegeben. Nach Entnahme von 1 ml Luft über das Septum der geschlossenen Flasche mit einer Spritze, wurden 1 ml 25 % H_2SO_4 hinzugegeben. Die Flasche wurde dann kräftig

geschüttelt, um das CO₂ aus der Lauge vollständig freizusetzen. Durch das Septum der Flasche wurde 1 ml aus dem Gasraum der Flasche entnommen und in einen Gaschromatographen GC-8A (Shimadzu, Kyoto, Japan) eingespritzt. An einer Edelstahl-Säule wurden die Gase O₂, N₂ und CO₂ in diesem bei 80 °C aufgetrennt. Als Trägergas diente Helium bei 50 ml min⁻¹. Die aufgetrennten Gase wurden mit einem Integrator 3390A (HP, Palo Alto, Kalifornien) quantifiziert. Ein Luftgemisch mit 0,999 Vol.-% CO₂ (Linde, München, Deutschland) diente als Standard. Bei 20 °C entsprach dieser CO₂-Gehalt einem anorganischen Kohlenstoffgehalt von 4,991 µg C ml⁻¹ Gas. Mit diesem Wert und dem korrigierten Flaschenvolumen (Flaschenvolumen abzüglich der Volumina der Lauge und der Säure) wurde anhand der Integrationswerte der Probe und des Standards der anorganische Kohlenstoffgehalt in den Laugen berechnet.

2.3.4 Mikrobielle Biomasse

Die Quantifizierung der mikrobiellen Biomasse erfolgte über die Chloroform Begasungstechnik (Jenkinson & Powlson 1976, Vance *et al.* 1987), bei der deren Kohlenstoffgehalt (Biomasse-C) ermittelt wird. Die zwei unterschiedlichen Techniken sind die CFI- (*chloroform fumigation incubation*) und die CFE-Methode (*chloroform fumigation extraction*). Beide Methoden beruhen auf einer Begasung der Bodenprobe mit Chloroform, durch die die Mikroorganismen im Boden abgetötet werden. Bei der CFI wird der Boden nachfolgend wiederbeimpft und das während einer 10-tägigen Inkubation freigesetzte CO₂ bestimmt. Dabei wird davon ausgegangen, dass die zuvor abgetöteten Mikroorganismen nach der Wiederbeimpfung in allen Böden zu einem gleichen Prozentsatz mineralisiert werden. Daher ist das freigesetzte CO₂ - abzüglich des CO₂ einer unbehandelten Kontrolle - ein Maß für den ursprünglich vorhandenen Biomasse-C (Jenkinson & Powlson 1976). Im Gegensatz dazu wird bei der CFE nach der Begasung der Kohlenstoff direkt aus dem Boden extrahiert und über Oxidationsmethoden in dem Extrakt bestimmt. Von diesem Wert wird der extrahierbare Kohlenstoff einer unbehandelten Kontrolle abgezogen und kann dann über einen Faktor (Vance *et al.* 1987) direkt in Biomasse-C umgerechnet werden.

2.3.4.1 CFI-Methode

Die CFI-Methode wurde zur Bestimmung des Biomasse-C in den Bodenvarianten direkt nach der Probennahme eingesetzt. Die Versuche wurden für jede Bodenvariante mit 50 g Boden und in vier Wiederholungen durchgeführt. Zur Begasung wurden die Proben in einen Exsikkator gegeben und darin 24 h in einer Chloroform-Atmosphäre inkubiert. Diese wurde durch das Hineinstellen eines Becherglases mit Chloroform und Absaugen der Luft mit Hilfe einer Vakuumpumpe erzeugt. Um eine Trocknung des Bodens zu verhindern, wurde zusätzlich eine mit Wasser gefüllte Schale in den Exsikkator hineingestellt. Nach der Inkubation wurde das Becherglas herausgenommen und die Chloroform-Rückstände in den Böden durch mehrfaches Evakuieren und Belüften entfernt. Die Kontrollböden wurden ebenfalls 24 h im Exsikkator, allerdings ohne Zugabe des Chloroforms und ohne Vakuum,

inkubiert. Stattdessen wurde der Boden des Exsikkators mit feuchten Tüchern ausgelegt und zusätzlich eine Schale mit Natronkalk hineingestellt, um das als HCO_3^- im Boden vorliegende CO_2 freizusetzen und zu absorbieren. Die Böden wurden mit 1 g frischen Boden beimpft und so in 1,5 l Weck-Glasgefäße gegeben, dass etwa die Hälfte der Bodenglasfläche frei blieb. Auf diese wurden zwei Gefäße gestellt, von denen eines 20 ml 2 N NaOH und das andere eine gleiche Menge Wasser enthielt. Die Weckgläser wurden gasdicht verschlossen und 10 Tage bei 22 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das NaOH in 25 ml Reagenzgläser überführt, mit einem Stopfen verschlossen und geschüttelt. Der CO_2 -Gehalt in der Lauge wurde dann wie zuvor beschrieben mit einem Gaschromatographen (Shimadzu) bestimmt (siehe 2.3.3). Hierfür wurden 1 ml aus der Lauge der begasten Proben bzw. 2 ml der Kontrollen eingesetzt. Die Messwerte wurden auf das Gesamtvolumen der Lauge bezogen und in $\text{CO}_2\text{-C}$ umgerechnet. Nach Berücksichtigung der Bodeneinwaage wurden die Messwerte der unbehandelten Kontrollen von denen für die begasten Proben abgezogen, um den durch die abgetöteten Mikroorganismen freigewordenen Kohlenstoff zu ermitteln. Da dieser Wert im Mittel bei 22 °C nur 41,1 % des tatsächlichen Biomasse-C entspricht (Anderson & Domsch 1978), wurde der erhaltene Wert danach noch durch 0,411 geteilt.

2.3.4.2 CFE-Methode

Die CFE-Methode wurde für die Bestimmung des Biomasse-C in Bodenproben nach unterschiedlichen Ultrabeschallungszeiten verwendet. Die Versuche wurden für jede Bodenvariante mit 20 g Boden und in drei Wiederholungen durchgeführt. Unbehandelter Boden wurde dabei in Erlenmeyerkolben eingewogen und in diesen in einen Exsikkator gestellt. Bodensuspensionen wurden in Zentrifugengläser überführt und 30 min bei 4.000 U min^{-1} bei Raumtemperatur in einer 4K10 Zentrifuge zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands wurde das Pellet durchmischt und in einen Exsikkator gestellt. Vor der Begasung wurden diese Proben zusätzlich mit $10 \mu\text{l}$ Chloroform g^{-1} Trockengewicht versetzt. Die Chloroformierung, Inkubation und Evakuierung im Exsikkator erfolgten analog zur CFI-Methode. Bei den Kontrollen wurde auf den Chloroformierungsschritt verzichtet und direkt mit der Extraktion fortgefahren. Zur Extraktion des Kohlenstoffs wurden die Proben mit 0,5 M K_2SO_4 -Lösung (im Verhältnis 1 : 4 zum Trockengewicht) versetzt und 30 min bei 250 U min^{-1} auf einem Horizontalschüttler LABOTRON (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) geschüttelt. Im Anschluss wurden die Bodensuspensionen durch einen Faltenfilter (602 $\frac{1}{2}$, Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) filtriert. Die Extrakte wurden bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung des Kohlenstoffs in den Extrakten erfolgte über Oxidation durch UV-Strahlen in Gegenwart von Kaliumperoxodisulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) und Quantifizierung des entstandenen CO_2 durch einen Infrarot-Analysator. Die Messungen wurden mit einem TOC Gerät (Elementar Analysensysteme, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Der C-Gehalt wurde aus der Differenz der Messwerte der begasten und unbegasten Proben berechnet. Zur Berechnung des Biomasse-C wurden die erhaltenen Werte mit einem Umrechnungsfaktor von 3,08 multipliziert (Vogt 2004).

2.4 Biochemische Arbeiten

2.4.1 Abbauprobungen mit ^{14}C -Markierung

Mit Hilfe von im Benzolring uniform ^{14}C -markiertem Phenol und 2,4-DCP sollte die Mineralisierung dieser Verbindungen über $^{14}\text{CO}_2$ Messungen verfolgt werden. Hierfür wurden Mischproben der Bodenvarianten eingesetzt. Dafür wurden jeweils 150 g Boden der Probenquadrate (A, B, C, D, vgl. Abb. 4) einer Parzelle gemischt und in eine Plastiktüte überführt. Der Boden wurde nachfolgend für sieben Tage bei 20 °C im Dunkeln konditioniert. Im Anschluss wurde die Bodenfeuchte bestimmt. Für die Versuche wurden 50 g (TG) von jeder Bodenvariante in vier Wiederholungen eingesetzt. Dafür wurde der Boden in 250 ml-Schottflaschen eingewogen, tröpfchenweise mit der jeweiligen wässrigen ^{14}C -Lösung (Tab. 4) versetzt und durchmischt. Das zu den Böden zugegebene Volumen wurde dabei so angepasst, dass nach der Zugabe eine Endkonzentration von 5 mM in der Wasserphase (entsprechend für Phenol 0,531 mg ml⁻¹ Bodenlösung bzw. für 2,4-DCP 0,875 mg ml⁻¹ Bodenlösung) vorlag und 50 bis 55 % der maximalen Wasserhaltekapazität in den Böden erreicht wurde (vgl. Tab. 5). Die Aktivitäten der ^{14}C -Lösungen betrugen 10,83 kBq ml⁻¹ (^{14}C -Phenol) bzw. 11,56 kBq ml⁻¹ (^{14}C -2,4-DCP).

Tab. 4 Zusammensetzung der ^{14}C -Lösungen für die Abbauprobungen.

Komponente	^{14}C -Phenol	^{14}C -2,4-DCP
Nicht markierte Substanz	67,78 mg	125,64 mg
Bidestilliertes Wasser	30 ml	50 ml
^{14}C -markierte Substanz	100 µl	150 µl

Tab. 5 Zugegebene Volumina der ^{14}C -Lösungen und daraus resultierende Bodenfeuchten und Endkonzentrationen in den Bodenvarianten bei den Abbauprobungen mit ^{14}C -Markierung. Die Ausgangskonzentration der Phenol-Lösung betrug 23,8 mmol l⁻¹, die der 2,4-DCP-Lösung lag bei 15,4 mmol l⁻¹.

		Zugegebenes Volumen (ml)	Bodenfeuchte vor Zugabe (%)	Bodenfeuchte nach Zugabe (%)	% WHK _{max} nach Zugabe	Endkonzentration nach Zugabe (mmol l ⁻¹)
^{14}C -Phenol	NIL	1,94	12,9	15,7	50	4,95
	NPK	2,00	12,8	15,8	49	5,10
	FYM	2,20	14,4	17,5	50	4,95
^{14}C -2,4-DCP	NIL	3,22	11,8	16,5	53	5,08
	NPK	3,10	11,4	16,0	49	5,14
	FYM	3,69	13,3	18,5	54	5,01

Die Inkubation der Bodenproben erfolgte in einem geschlossenen System (Abb. 6). In diesem wurde durch eine Pumpe Raumluft angesaugt und durch einen Schlauch mit Natronkalk, eine Waschflasche mit 2 N NaOH und eine Waschflasche mit Wasser geführt. Diese nun CO₂ freie, angefeuchtete Luft strömte dann über einen Verteiler und Gummischläuche in die Schottflaschen, um das im Boden gebildete CO₂ und $^{14}\text{CO}_2$ durch Kapillarschläuche in Reagenzgläser mit 25 ml 2 N NaOH zur Absorption zu überführen. Die

Reagenzgläser wurden täglich ausgetauscht und durch neue mit „frischer“ Natronlauge ersetzt. Beim Phenol-Versuch erfolgte ein zusätzlicher Wechsel der Lauge nach 6 und 12 h. Der Luftstrom wurde mit einem digitalen Strömungsmesser (Analyt, Müllheim, Deutschland) über eine durch den Silikon-Stopfen der Reagenzgläser gestochene Kanüle überprüft. Die Pumpe wurde dabei so eingestellt, dass die Strömungsgeschwindigkeit bei allen Proben zwischen 4 und 8 ml min⁻¹ lag. Die Inkubation der Böden erfolgte für 15 (Phenol) bzw. 21 Tage (2,4-DCP).

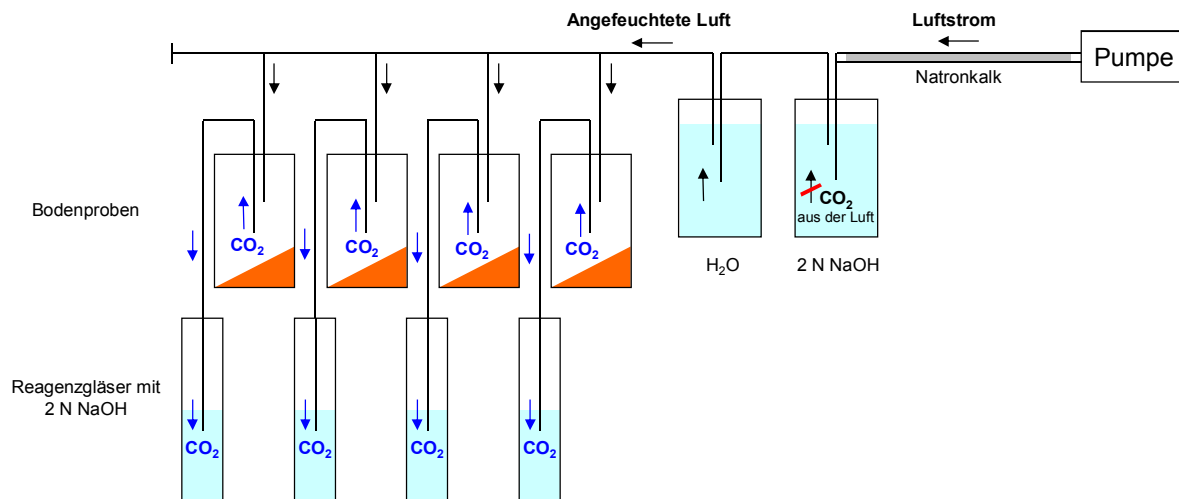


Abb. 6 Inkubationssystem für die Abbauprobe (Schematische Darstellung).

Um den Abbau der markierten Verbindung zu verfolgen, wurde die Aktivität des ¹⁴CO₂ in den Laugen bestimmt. Zur Erstellung von Aktivitätsbilanzen wurde am Versuchsende außerdem die verbliebene Aktivität im Boden bestimmt. Die Messungen erfolgten dabei über Flüssigszintillation (2.4.3). Um den Anteil des in die Biomasse eingebauten radioaktiven Kohlenstoffs zu ermitteln, wurden von jeder Probe 15 g (TG) entnommen und daraus der Biomasse-C über die CFE-Methode (2.3.4) extrahiert. Als Kontrolle dienten 15 g Boden derselben Probe ohne Chloroformbehandlung. Die Aktivität wurde im Anschluss über Flüssigszintillationsmessungen (2.4.3) direkt in den Extrakten ermittelt. Um die zu den Proben ursprünglich zugegebene Aktivität zu berechnen, wurden Aliquote der ¹⁴C-Lösungen vermessen und auf das zu den Bodenvarianten zugegebene Volumen bezogen.

Aufgrund der Ergebnisse des Abbauprobe mit ¹⁴C-2,4-DCP sollte in einem zusätzlichen Experiment geprüft werden, ob eine Zugabe von Mineräldünger die Mineralisierung der Verbindung beeinflusst. Dazu wurde der Boden mit einer Minerallösung (NPK-Flüssigdünger) versetzt. Das zuzugebende Volumen der Minerallösung wurde dabei anhand des Stickstoffgehalts im Dünger und einer üblichen Düngungsmenge von 100 kg N ha⁻¹ Boden berechnet. Dazu wurde zunächst die auf einem Hektar mit einem 30 cm Pflughorizont vorliegende Bodenmenge berechnet (2) und daraus die N-Zugabe für 50 g Boden abgeleitet (3). Anhand der N-Konzentration in der Minerallösung ließ sich daraufhin das Volumen bestimmen, das für eine äquivalente Düngung notwendig wäre (4).

$$(2) \quad 1 \cdot 10^8 \text{ cm}^2 \cdot 30 \text{ cm} \cdot 1,4 \text{ g Boden cm}^{-3} = 420 \cdot 10^7 \text{ g Boden}$$

$$1 \text{ ha} = 10.000 \text{ m}^2 = 1 \cdot 10^8 \text{ cm}^2$$

$$(3) \quad \frac{50 \text{ g Boden} \cdot 100 \text{ kg N}}{4,2 \cdot 10^9 \text{ g Boden}} = 1,1905 \cdot 10^{-6} \text{ kg N} = \underline{1,1905 \text{ mg N}}$$

$$(4) \quad \frac{1,1905 \text{ mg N} \cdot 1 \text{ ml}}{97 \text{ mg N}} = 0,0123 \text{ ml} = \underline{12,3 \mu\text{l}}$$

$$\text{N-Gehalt des Flüssigdüngers} = 97 \text{ mg N ml}^{-1}$$

Eine Bodenmenge von 50 g wurde daher mit 12,3 μl der Minerallösung versetzt. Dafür wurde ein zum Erreichen dieses Endvolumens entsprechendes Volumen der Minerallösung zu der ^{14}C -2,4-DCP-Lösung hinzugefügt und gemeinsam mit dieser zugegeben. Die Inkubation der Böden erfolgte unter den zuvor beschriebenen Bedingungen.

2.4.2 Adsorptionsversuche

Anhand von experimentellen Untersuchungen sollte das Sorptionsverhalten von Phenol und 2,4-DCP in Abhängigkeit vom organischen Kohlenstoffgehalt und der Konzentration der Verbindung im Boden, sowie die Verteilung in den Korngrößenfraktionen betrachtet werden. Hierfür wurden Adsorptionsversuche nach der OECD-Richtlinie 106 (OECD 2000) durchgeführt. Die untersuchten Konzentrationen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6 Schadstoff-Konzentrationen (mM) der Adsorptionsansätze. Dargestellt sind die Konzentrationen, die zur Analyse des Sorptionsverhaltens an den nicht-fraktionierten Bodenvarianten und der Korngrößenfraktionen ausgewählt wurden.

Untersuchung		Phenol	2,4-DCP*
Nicht-fraktionierter Boden	Konzentration (mM)	0,001, 0,01, 0,1, 1*, 10*	0,001, 0,01, 0,1, 1, 10
Korngrößenfraktionen	Konzentration (mM)	0,1, 1*, 10*	0,001, 0,1, 10

*= in Zusammenarbeit mit Denis Finke und Anke Köhler durchgeführt (Finke 2009, Köhler 2010)

Zunächst wurden Mischproben von jeder Bodenvariante erstellt. Dafür wurden jeweils 150 g Boden der Probenquadrate (A, B, C, D, vgl. Abb. 4) einer Parzelle vereinigt. Sichtbare Pflanzenreste wurden entfernt und der Boden über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Am nächsten Tag wurde die Bodenfeuchte bestimmt. Für den Versuch wurden jeweils 10 g Boden (TG) in drei Wiederholungen für jede Konzentration eingewogen. Die Bodenmenge wurde in einem 200 ml-Zentrifugenglas mit 2,5 ml Quecksilberchlorid-Lösung (0,333 g HgCl_2 in 100 ml 0,01 M CaCl_2) tropfenweise angefeuchtet und 24 h inkubiert. Dieser Schritt diente dazu den Boden zu sterilisieren (Wolf *et al.* 1989), um eine Beeinflussung des Sorptionsverhaltens durch mikrobielle Abbauprozesse ausschließen zu können. Daraufhin wurden 45 ml einer 0,01 M CaCl_2 -Lösung hinzugefügt und die Proben bei 250 U min^{-1} und 20°C über Nacht auf einem Rotationsschüttler geschüttelt, um ein gleichmäßiges Ionengleichgewicht in allen suspendierten Bodenproben zu erhalten. Drei Kontrollen, Ansätze ohne Bodenzugabe, wurden ebenso behandelt. Um die gewünschten unterschiedlichen Endkonzentrationen von

0,001 bis 10 mM in der Wasserphase zu erhalten, erfolgte am nächsten Tag die Zugabe von 0,025, 0,25 bzw. 2,5 ml einer 2 bzw. 200 mM Stammlösung (in 0,01 M CaCl_2 -Lösung) der nicht markierten Verbindung. Gleichzeitig wurden 50 oder 100 μl der jeweiligen ^{14}C -markierten Verbindung hinzugegeben. Mit dieser konnte die Verteilung der phenolischen Substanzen zwischen Boden und wässriger Phase nach Ende der Sorption quantifiziert werden. Die Gesamtaktivität in diesem zugegeben Volumen betrug für das Phenol zwischen 12,94 und 18,24 kBq und für das 2,4-DCP 20,60 kBq. Um das im Protokoll vorgesehene Verhältnis von 1 : 5 von Boden zu wässriger Phase einzuhalten, wurde das fehlende Volumen zu 50 ml nach Zugabe der inaktiven und radioaktiven Verbindung mit destilliertem Wasser ergänzt. Für die Ansätze der Konzentration von 10 mM beim 2,4-DCP war aufgrund der begrenzten Löslichkeit des Schadstoffs ein größeres Volumen der Stammlösung notwendig. Daher wurden diese Ansätze nach der Äquilibration mit der CaCl_2 -Lösung 10 min bei 3.200 U min^{-1} in einer 4K10 Zentrifuge zentrifugiert. Im Anschluss wurden 22,5 ml des Überstands entnommen und 24,9 ml einer 0,02 mM 2,4-DCP-Stammlösung, sowie 100 μl der ^{14}C -2,4-DCP-Lösung hinzugegeben. Nach 5 min Schütteln wurde aus den Kontrollen 500 μl entnommen und zur Bestimmung der Ausgangsaktivität durch Flüssigszintillation (2.4.3) gemessen. Im Anschluss wurden die Proben und Kontrollen für 48 h bei 20°C über Nacht im Dunkeln geschüttelt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 4.000 U min^{-1} ($2646 \times g$) in einer 4K10 Zentrifuge wurden 500 μl des Überstands entnommen. Die Aktivität in dem Aliquot wurde über Flüssigszintillation bestimmt. Der verbliebene Überstand wurde möglichst vollständig abpipettiert, die Zentrifugengläser mit Parafilm abgeklebt und die zu fraktionierenden Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Zur Fraktionierung wurden die Bodenproben aufgetaut und in 50 ml destilliertem Wasser resuspendiert. Die Korngrößenfraktionierung wurde danach wie zuvor beschrieben durchgeführt (2.2.3). Nach Trocknung der Korngrößenfraktionen bei 40°C , wurde das sorbierte ^{14}C durch Verbrennung der Böden und Messung über Flüssigszintillation bestimmt.

Auswertung der Adsorptionsversuche

Die Phenol- bzw. 2,4-DCP-Gehalte im Boden wurden indirekt über die Messung der ^{14}C -Aktivität (2.4.3) in den Überständen bestimmt. Die ermittelten Aktivitäten in der wässrigen Lösung wurden hierfür zunächst ins Verhältnis zu der zugegebenen Gesamtaktivität gesetzt. Anhand dieses Verhältnisses und der bekannten zugegebenen Schadstoffmengen, wurden die Gehalte im Überstand berechnet. Die Phenol- bzw. 2,4-DCP-Gehalte im Boden ergaben sich dann aus der Differenz der Werte im Überstand und der Gesamtzugabe. Auf Grundlage der ermittelten Werte wurde anschließend nach der OECD-Richtlinie 106 (OECD 2000) die prozentuale Sorption (5), der Verteilungskoeffizient K_d (6) und der K_{oc} -Wert (7) berechnet. Der Verteilungskoeffizient (K_d -Wert) beschreibt das Verhältnis zwischen dem Gehalt der Substanz am Boden und ihrer Konzentration in der wässrigen Lösung, wenn das Sorptionsgleichgewicht erreicht ist. Der K_{oc} -Wert ist der auf den C_{org} -Gehalt in einer Bodenprobe bezogene Verteilungskoeffizient.

$$(5) A_{48h} = \frac{m_s^{ads} \cdot 100}{m_0} (\%)$$

A_{48h} = Prozentuale Sorption (%)
 m_s^{ads} = Sorbierte Menge der Substanz (μg)
 m_0 = Zugegebene Menge der Substanz (μg)

$$(6) K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{Boden}}$$

K_d = Verteilungskoeffizient im Gleichgewichtszustand ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)
 $C_s^{ads}(eq)$ = Konzentration der Substanz am Boden im Gleichgewichtszustand ($\mu\text{g g}^{-1}$)
 $C_{aq}^{ads}(eq)$ = Massenkonzentration der Substanz in der wässrigen Phase im Gleichgewichtszustand (ermittelt in Bezug zur Gesamtzugabe) ($\mu\text{g cm}^3$)
 $m_s^{ads}(eq)$ = Sorbierte Menge der Substanz am Boden im Gleichgewichtszustand (μg)
 $m_{aq}^{ads}(eq)$ = Sorbierte Menge der Substanz in der Lösung im Gleichgewichtszustand (μg)
 V_0 = Ausgangsvolumen der wässrigen Phase mit Bodenkontakt (cm^3)
 m_{Boden} = Menge des Bodens (Trockengewicht) (g)

$$(7) K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}$$

K_{oc} = Verteilungskoeffizient, bezogen auf den organischen Kohlenstoff-Gehalt ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)
 K_d = Verteilungskoeffizient ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)
 $\%oc$ = Gehalt an organischem Kohlenstoff in der Bodenprobe (g g⁻¹)

2.4.3 Quantifizierung der ¹⁴C-Aktivität

Zur Bestimmung der Radioaktivität in Bodenproben und Lösungen wurde die Flüssigszintillations-Methode (*liquid scintillation counting*) angewendet. Bei dieser wird die durch ¹⁴C emittierte β -Strahlung einer Probe in einem Szintillationscocktail mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers (LSC) gemessen. Der hierzu verwendete Cocktail enthält einen Szintillator sowie ein Lösungsmittel, das diesen und die zu messende Probe löst und die Energie der Strahlung als Anregungsenergie aufnimmt. Diese Energie wird dabei auf den Szintillator übertragen und von diesem in Lichtquanten umgewandelt. Die entstehenden Lichtblitze können dann durch einen Photomultiplier im LSC in elektrische Impulse umgewandelt und als Messwert (*counts per minute*, CPM) ausgegeben werden. Durch in der Flüssigkeit vorliegende chemische Substanzen und die mögliche Einfärbung von Proben kann der gemessene Wert jedoch verfälscht werden. So absorbieren einige Substanzen die Elektronen, um einen energetisch günstigeren Zustand zu erreichen. Dies führt dazu, dass nicht alles Fluoreszenzlicht am Photomultiplier ankommt und ein geringerer Aktivitätswert (CPM) gemessen wird (*Quenching*). Da der Effekt bei jeder Probe unterschiedlich sein kann, muss der *Quench*-Wert bei der Berechnung der tatsächlichen Radioaktivität jeder einzelnen Probe berücksichtigt werden. Diese Umrechnung kann über eine im LSC abzuspeichernde Kalibriergerade (*Quench-Kurve*) automatisch vor der Datenausgabe erfolgen. Hierzu dient die Kennzahlmethode, bei der ausgenutzt wird, dass durch den *Quench* eine Verschiebung des Impulsspektrums zu niedrigeren Energien hin erfolgt. Aus dieser Verschiebung ergibt sich eine Kennzahl ($H^\#$), der über Vergleichsmessungen ohne *Quench*-Zugabe ein Wirkungsgrad (Effizienz) zugeordnet werden kann. Aus der Kennzahl kann dann über die aufgenommene *Quench*-Kurve der zugehörige Wirkungsgrad in unbekannten Proben ermittelt und die gefundene Zählrate auf die absolute Aktivität umgerechnet werden. Hierbei werden die CPM-Werte in DPM (*disintegrations per minute*) konvertiert. Da es sich bei der gemessenen Strahlung um statistische Zufallsereignisse handelt, hängt die Messdauer, bis zum Erreichen eines nur mit einem geringen Fehler behafteten Messwerts von der Radioaktivität in einer Probe ab. Bei niedrigeren Aktivitäten ist also eine längere Messdauer notwendig. Um dies zu berücksichtigen, erfolgte die Messung der Proben mit hohen Aktivitäten für maximal 20 min und der mit niedrigeren für maximal 120 min bzw. bis

zum Erreichen eines Fehlerwertes $< 2\%$. Durchgeführt wurden die Messungen in einem LS 1801 Flüssigszintillationszähler (Beckman Coulter, La Brea, Kalifornien).

2.4.3.1 Erstellung der *Quench*-Kurve

Zur Erstellung der *Quench*-Kurve diente ein ^{14}C -Standard mit bekannter Radioaktivität, dem in einer Messreihe unterschiedliche Mengen einer *Quencher*-Substanz hinzugefügt wurden. In diesem Fall wurden $20\ \mu\text{l}$ eines ^{14}C -Toluol-Standards ($0,32\ \text{KBq}$) mit 25 bis $300\ \mu\text{l}$ Nitromethan versetzt. Anhand der Messwerte wurde vom LSC automatisch die *Quench*-Kurve berechnet (Abb. 7). Diese wurde im LSC gespeichert und als Referenz bei allen weiteren Messungen verwendet.

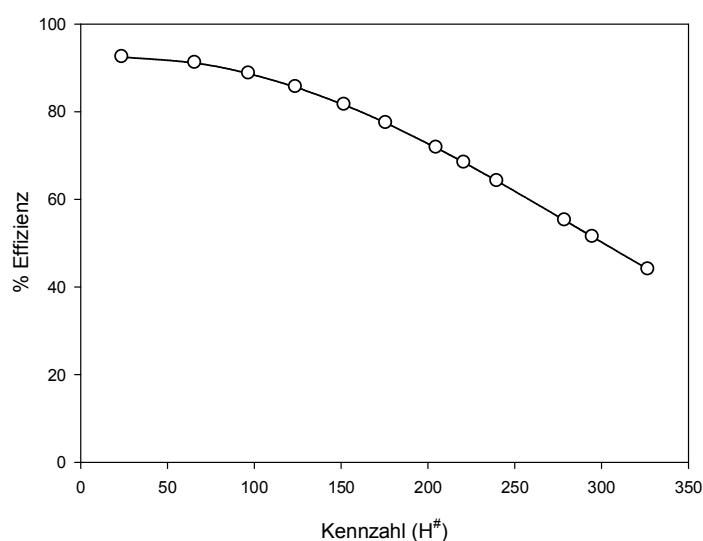


Abb. 7 *Quench*-Kurve zur Berechnung der ^{14}C -Aktivität im Flüssigszintillationszähler.

2.4.3.2 Aktivitätsbestimmung in wässrigen Lösungen

Für die Vermessung von wässrigen Proben wurden $0,5$ bis $4\ \text{ml}$ Aliquote entnommen und zu $18\ \text{ml}$ eines gebrauchsfertigen Rotiszint® eco-plus Szintillationscocktails (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegeben und in $20\ \text{ml}$ -Szintillationsgläsern gemischt. Nach kurzem Stehenlassen waren die Proben sofort messbereit. Bei der Vermessung von Laugen war zu berücksichtigen, dass bei der Vermischung von Alkalien mit der Szintillationsflüssigkeit die sogenannte Chemolumineszenz auftritt. Dieses Phänomen beschreibt eine zusätzliche Entstehung von Lichtereignissen, die ebenfalls von den Photomultipliern des Szintillationsgerätes registriert und fälschlicherweise als Radioaktivität gemessen werden. Das Szintillationsgerät ist jedoch in der Lage das etwaige Ausmaß der Chemolumineszenz zu detektieren und durch eine ausgedruckte Messzahl (RCM-Wert) anzuzeigen. Bei der Vermessung von Laugen mit geringen Aktivitäten lag in vielen Fällen ein hoher RCM-Wert ($> 2\%$) vor. Dies stellte einen Hinweis auf Chemolumineszenz dar, die durch die Hydroxidionen (OH^-) in der Lauge hervorgerufen wurde. Um diese zu verringern, wurden die

Hydroxidionen in den Proben vor der Messung durch Säurezugabe reduziert. Hierfür wurden 2 ml Lauge unter Beibehaltung eines alkalischen pH-Wertes (> 11) mit bis zu 1,5 ml 33 % Essigsäure versetzt. Die so behandelten Proben wurden mit dem Szintillationscocktail vermischt, über Nacht im Dunkeln stehen gelassen und am nächsten Tag im LSC gemessen.

2.4.3.3 Aktivitätsbestimmung in Bodenproben

Da Boden die abgegebenen Elektronen des ^{14}C stark absorbiert, ist eine direkte Messung der Aktivität in diesem nicht möglich. Daher wurden Bodenproben in einem Biological Oxidizer Ox 300 (R.J. Harvey Instrument Corporation, Hillsdale, New Jersey) bei einer hohen Temperatur (900 °C) in Sauerstoffatmosphäre verbrannt und das entstehende CO_2 in einem gebrauchsfertigen Szintillationscocktail C-400 (Zinsser-Analytic, Frankfurt, Deutschland) aufgefangen. Die Proben wurden hierfür zunächst bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Von nicht-fraktionierten Böden wurden dann 0,5 g und von den Korngrößenfraktionen Mengen zwischen 0,3 (Ton) und 0,5 g in Porzellanschiffchen eingewogen. In allen Fällen wurde die Verbrennung mit drei parallelen Proben durchgeführt. Einzige Ausnahme bildeten die Sandfraktionen, bei denen die gesamte Probe auf zwei Schiffchen aufgeteilt und verbrannt wurde. Die ^{14}C -Aktivität im Szintillationscocktail wurde wie zuvor beschrieben mit dem LSC bestimmt.

2.5 Molekularbiologische Arbeiten

2.5.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion von DNA erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit dem Bio101 FastDNA Spin Kit for Soil® (MP Biomedicals, Solon, Ohio). Hierfür wurden 0,05 bis 0,5 g Aliquote der Bodenproben in zum Kit gehörende *Lysing Matrix E*-Extraktionsgefäße mit Glasperlen (Beads) gegeben und anschließend mit 950 µl Natriumphosphatpuffer und 120 µl MT-Puffer (beide MP Biomedicals) versetzt. Im Anschluss erfolgte der Zellaufschluss in den Gefäßen durch zweimal 45 s *bead beating* bei $6,5 \text{ m s}^{-1}$ in einem FastPrep®-24-Gerät (MP Biomedicals). Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Während der Extraktion wurden die Gewichte der Extraktionsgefäße und Auffanggefäße gewogen, um anschließend den prozentualen DNA-Verlust während der Aufarbeitung zu bestimmen.

Die DNA-Extrakte wurden zur Entfernung von PCR-Inhibierenden Substanzen (z. B. Huminsäuren) zusätzlich mit GENE CLEAN®-Säulen (MP Biomedicals) gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Dabei wurden 5 µl der DNA-Extrakte eingesetzt und mit 45 µl hochreinem DNase- und RNase-freiem PCR-Wasser (Fluka, Buchs, Schweiz) verdünnt.

Für die Extraktion von DNA aus größeren Bodenmengen und Bodensuspensionen wurde das PowerMax® Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio, Carlsbad, Kalifornien) verwendet. Für

Bodenproben wurden 10 g (TG) eingewogen. Aus Bodensuspensionen wurde ein Aliquot von 30 ml entnommen, in ein 50 ml-Falconröhrchen überführt, zentrifugiert und das Pellet für die DNA-Extraktion verwendet. Die DNA-Extraktion und -aufarbeitung erfolgte auf der Basis von mechanischen und chemischen Lysis- und Waschschritten und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Aufarbeitung der Korngrößenfraktionen für die DNA-Extraktion

Da die DNA nach der Korngrößenfraktionierung direkt aus den feuchten Fraktionen ohne vorherige Trocknung isoliert werden sollte, waren zusätzliche Schritte bei der Aufarbeitung während der Korngrößenfraktionierung (2.2.3) erforderlich.

Von der Sandfraktion ($> 63 \mu\text{m}$) wurden direkt nach dem Siebschritt etwa 0,6 g (Feuchtgewicht) aus dem Sieb entnommen und in ein leeres 2,0 ml-Extraktionsgefäß aus dem FastDNA-Kit (MP Biomedicals) gegeben. Der restliche Siebinhalt wurde bei 40°C über Nacht getrocknet. Die Grobschlufffraktion ($20\text{--}63 \mu\text{m}$) wurde vom Sieb in ein kleines Becherglas mit bekanntem Gewicht überführt und mit so viel Wasser versetzt, dass in einem Aliquot von 2 ml etwa 0,5 g (TG) der Fraktion vorlagen. Nach kurzem schnellen Rühren mit einem Rührkern, wurden daraus dreimal 1,8 ml entnommen und in ein leeres 2,0 ml-DNA-Extraktionsgefäß, sowie in zwei Gläschen, die der Bestimmung des Trockengewichts in den 1,8 ml dienten, überführt. Die restliche $20\text{--}63 \mu\text{m}$ -Suspension und die 1,8 ml in den Gläschen wurden bei 40°C über Nacht getrocknet.

Nach der Sedimentation der Feinschlufffraktion ($2\text{--}20 \mu\text{m}$) wurde der Überstand abgegossen und das Pellet in ein Zentrifugenglas überführt. Dieses wurde mit so viel Wasser versetzt, dass in 2 ml etwa 0,5 g (TG) vorlagen. Nach kurzem Rühren der Suspension wurden der Grobschlufffraktion entsprechende Aliquote entnommen und wie dort beschrieben weiterbehandelt. Das Sediment der Tonfraktion ($< 2 \mu\text{m}$) wurde nach Abgießen eines Großteils des Überstands in dem verbleibenden Restwasser resuspendiert und in ein Zentrifugenglas überführt. Nach 10 min Zentrifugation bei 4.000 U min^{-1} wurde der Überstand abgegossen, ein weiterer Teil der $< 2 \mu\text{m}$ Suspension hinzugefügt und nochmals zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis sich die gesamte $< 2 \mu\text{m}$ -Fraktion in dem Zentrifugenglas befand. Das Pellet wurde danach mit destilliertem Wasser versetzt, so dass in 1 ml etwa 0,125 g (TG) der Fraktion vorlagen. Nach kurzem Rühren wurde dreimal je ein 1 ml Aliquot entnommen und in ein 2,0 ml-Extraktionsgefäß und zwei Gläschen gegeben.

Die Gläschen wurden äquivalent zu den anderen Fraktionen über Nacht getrocknet. Die Aliquote der vier Korngrößenfraktionen in den 2,0 ml-Extraktionsgefäßen wurden 5 min bei $11.500 \text{ U min}^{-1}$ abzentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Danach wurden die zuvor entnommenen Glasperlen aus dem Extraktionskit für den Zellaufschluss dazugegeben. Die Proben wurden bis zur DNA-Extraktion im Kühlschrank aufbewahrt. Die DNA-Extraktion erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben mit dem FastDNASpinKit for Soil (MP). Aufgrund der dunklen Färbung einiger DNA-Extrakte, was auf

das Vorkommen von Huminsäuren hindeutete, wurde bei allen Proben der zusätzliche Aufreinigungsschritt mit GENE CLEAN®-Säulen (MP) durchgeführt.

Durch Gewichtsbestimmung der getrockneten Aliquote in den Gläschen konnte auf das Trockengewicht in den zur Extraktion eingesetzten Volumina (1,8 bzw. 1,0 ml) geschlossen werden. Das Trockengewicht der Sandfraktion wurde aus dem Feuchtgewicht des Pellets in dem 2,0 ml DNA-Extraktionsgefäß nach der Zentrifugation und dem Abpipettieren des Überstands abgeleitet. Anhand der Trockengewichte der vier Korngrößenfraktionen auf den Sieben und in den Glasgefäßen konnte unter Berücksichtigung der entnommenen Mengen die Korngrößenverteilung in den Bodenvarianten berechnet werden.

2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um gezielt die SSU rRNA-Genabschnitte von Mikroorganismengruppen in den Boden-DNA-Extrakten untersuchen zu können, wurde die PCR-Methode (Mullis & Faloona 1987) eingesetzt. Die PCR-Reaktion erfolgte in programmierbaren Thermocyclern (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland). Eine Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer kann Tabelle 55 im Anhang entnommen werden.

2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für eine erste Einschätzung von Produktmengen und zur Überprüfung von Fragmentgrößen erfolgte die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Extrakten und PCR-Produkten auf einem Agarosegel. Dabei wurden 3 µl (Gesamt-DNA) bzw. 8 µl (PCR-Produkte, Plasmide) der Proben mit 2 µl Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) vermischt und in Abhängigkeit von der erwarteten Produktgröße auf ein 0,8 % (Gesamt-DNA), 1 % (PCR-Produkte) oder 2 % (qPCR-Produkte) Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 45 bis 60 min bei 70 bis 110 V. Als Standard wurden DNA-Größenmarker (Fermentas) mit aufgetragen. Die Betrachtung und Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Transilluminator System (Vilber Lourmat, München, Deutschland).

2.5.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der in den Proben enthaltenen DNA erfolgte mit Hilfe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs PicoGreen® (MoBiTec, Göttingen, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben. Der durch die Einlagerung des Farbstoffs in die DNA entstehende Komplex kann durch Licht bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt werden und emittiert dadurch Licht bei einer Wellenlänge von 530 nm. Die DNA-Konzentration in einer Probe kann daher anhand dieser Fluoreszenz und Vergleich mit Proben mit bekannter DNA-Konzentration bestimmt werden. Als Messgeräte kamen ein Labsystems Fluoroscanner II (GMI, Albertville, Minnesota) und ein Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad,

Deutschland) zur Anwendung. Zur Erstellung einer Standard-Verdünnungsreihe mit bekannten DNA-Konzentrationen diente λ -DNA (MoBiTec). Diese und die DNA-Extrakte wurden mit TE-Puffer verdünnt und zur Fluoreszenzbestimmung eingesetzt. Gesamt-DNA-Extrakte wurden hierbei in 500-, 1000- und 2000-facher Verdünnung, mit GENE CLEAN® aufgereinigte DNA-Extrakte, sowie PCR-Produkte in 100-, 200- und 1000-facher Verdünnung, vermessen. Für die Messung wurden 25 oder 100 μ l der Standard- und Probenverdünnungen auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz in den Verdünnungen erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens einer PicoGreen®-Stammlösung (200-fach in TE-Puffer verdünnt) zu den Ansätzen. Nach 4-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde dann die absolute Fluoreszenz gemessen. Von dieser wurde die Hintergrundfluoreszenz abgezogen. Die DNA-Konzentrationen in den Proben konnten anhand der Standard-Verdünnungsreihe berechnet werden. Hierfür wurde auf Grundlage der bekannten Konzentration und der gemessenen Fluoreszenzen eine Standardgerade erstellt, mit deren Gleichung die Berechnung der DNA-Konzentration in den Proben erfolgte.

2.5.5 Quantitative „real-time“ PCR (qPCR)

Um eine quantitative Aussage über die Zusammensetzung von Mikroorganismen-Gemeinschaften treffen zu können, wurde die qPCR-Technik eingesetzt (Higuchi *et al.* 1993). Im Gegensatz zur klassischen PCR, bei der nur der qualitative Nachweis von amplifizierten DNA-Abschnitten möglich ist, wird bei der qPCR die DNA-Zunahme in den Ansätzen während des gesamten Laufs detektiert. Dies wird durch einen Fluoreszenzfarbstoff in den Ansätzen ermöglicht, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Der dabei entstehende Komplex wird durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittiert Licht bei einer anderen Wellenlänge, das nach jedem PCR-Zyklus im Gerät gemessen wird (Abb. 8).

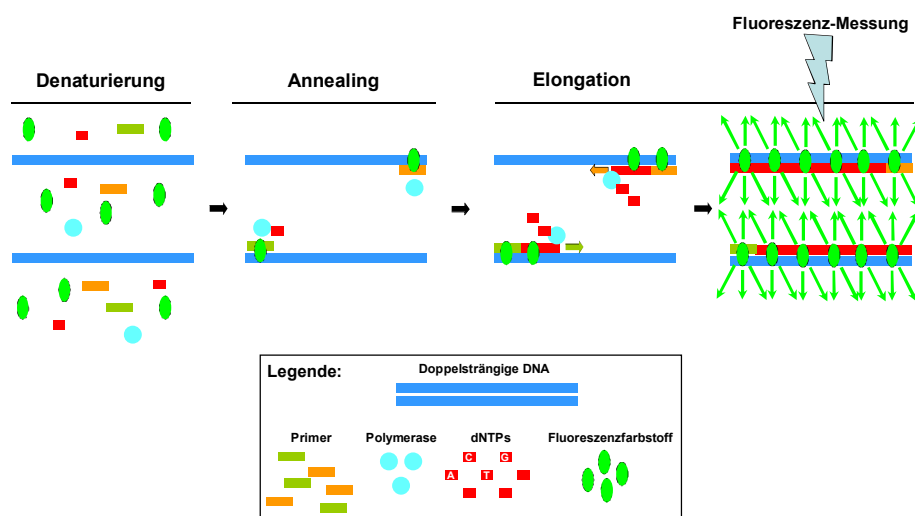


Abb. 8 Prinzip der Fluoreszenz-Detektion bei einer qPCR mit DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoffen.

Durch fortwährende Messung des Fluoreszenzanstiegs ergeben sich für jede Probe charakteristische von der DNA-Ausgangskonzentration abhängige Amplifikationskurven (Abb. 9 links).

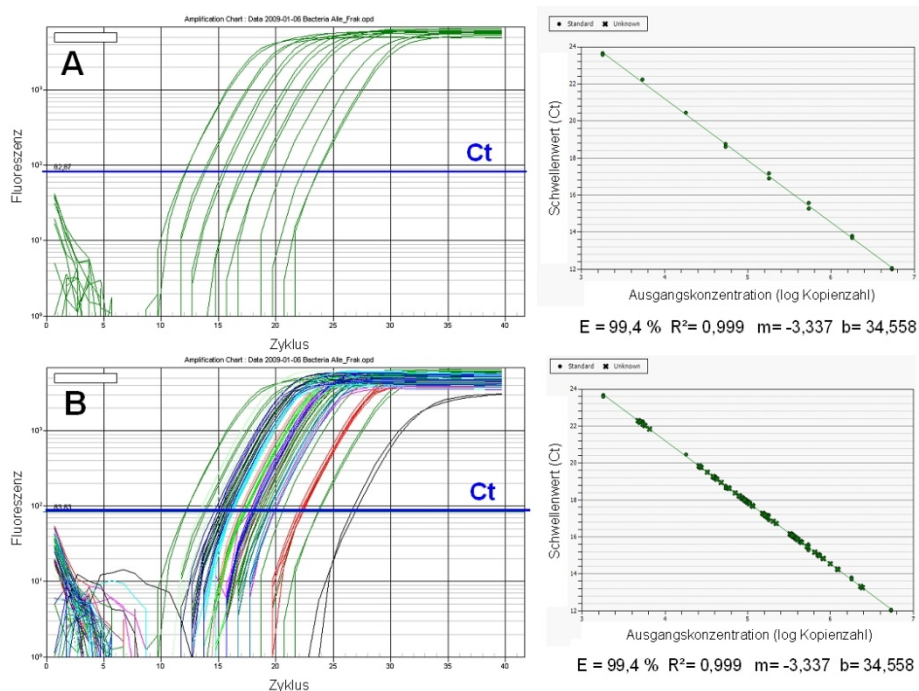


Abb. 9 Amplifikationskurven (links) und Standardgerade (rechts) eines qPCR-Laufs. (A) zeigt nur die Proben der Standard-Verdünnungsreihe, (B) alle Proben die in dieser qPCR untersucht wurden.

Die Auswertung der Kurven beruht auf dem Schwellenwert Ct (*Cycle Threshold*), der die PCR-Zykluszahl angibt, bei der sich das Fluoreszenzsignal in einem Ansatz deutlich vom Hintergrund unterscheidet. Mit Hilfe einer Standard-Verdünnungsreihe mit bekannten Anfangs-Kopienzahlen kann auf Grundlage dieses Werts eine Standardgerade erstellt werden, mit der die Ausgangsmengen (Kopienzahlen) in allen Proben eines qPCR-Laufs über die Gleichung (8) berechnet werden können (Abb. 9 rechts).

$$(8) \quad \text{Kopienzahl} = 10^{\frac{Ct-b}{m}}$$

Ct = Cycle Threshold
m = Steigung der Amplifikationsgeraden
b = y-Achsenabschnitt der Amplifikationsgeraden

Ein wichtiges Maß für eine robuste und reproduzierbare qPCR-Reaktion stellt die Reaktionseffizienz dar. Diese ergibt sich nach (9) aus der Steigung der Standardgeraden und spiegelt die Amplifikationsrate während der PCR-Reaktion wider. Unter idealen Bedingungen verdoppelt sich die Anzahl der PCR-Produkte bzw. der Kopienzahlen mit jedem Zyklus einer PCR (logarithmische Phase), bis es zu einer Substratlimitierung kommt (Plateauphase). Eine Verdopplung entspräche einer Effizienz von 2 und die Steigung der Standardgeraden einer solchen PCR-Reaktion läge bei -3,32 (10). Meist wird die Reaktionseffizienz, die nach einem qPCR-Lauf anhand der Standard-Verdünnungsreihen berechnet wird, in Prozent ausgedrückt (11). In der Praxis sollten hierbei Werte zwischen

90 und 105 % erreicht werden, damit eine Verfälschung der Ergebnisse durch nicht optimales Primerdesign und ungünstige Reaktionsbedingungen (niedrigere Reaktionseffizienzen) oder durch die Amplifikation von unspezifischen Nebenprodukten (höhere Reaktionseffizienzen) ausgeschlossen werden kann.

$$(9) \quad \text{Effizienz (E)} = 10^{\frac{-1}{m}}$$

$$(10) \quad 2 = 10^{\frac{-1}{m}} \Leftrightarrow \lg 2 = \frac{-1}{m} \Leftrightarrow m = \frac{-1}{\lg 2} = -3,32$$

$$(11) \quad E \% = (E - 1) \cdot 100 \%$$

2.5.5.1 Herstellung der Standards für die qPCR

Als Ausgangsmaterial für die Erstellung der qPCR-Standards dienten Reinkulturen von Boden-Mikroorganismen aus der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) (Tab. 7).

Tab. 7 Übersicht über die verwendeten qPCR Standards und die ermittelten DNA-Kopienzahlen der unverdünnten Plasmide.

Standard für	Ursprung der DNA	DSMZ Stamm Nr.	DNA-Kopienzahl μL^{-1}
Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>	4872	$5,38 \cdot 10^8$
Archaea	<i>Methanobacterium oryzae</i>	11106	$1,26 \cdot 10^{10}$
Fungi	<i>Fusarium culmorum</i>	62191 / 1094*	$9,13 \cdot 10^9$

*= Es wurde eine Mischung dieser beiden Stämme verwendet

Die DNA dieser Stämme wurde mit dem FastDNA Kit (MP Biomedicals) nach Herstellerangaben extrahiert und die gewonnenen Extrakte als DNA-Vorlage für die Amplifikation (*Template*) in einer PCR mit gruppenspezifischen Primern (Tab. 8-10) eingesetzt. Die amplifizierten DNA-Abschnitte wurden hierbei so gewählt, dass sie die rRNA-Zielsequenz der in der qPCR verwendeten Primerpaare beinhalteten (Abb. 10).

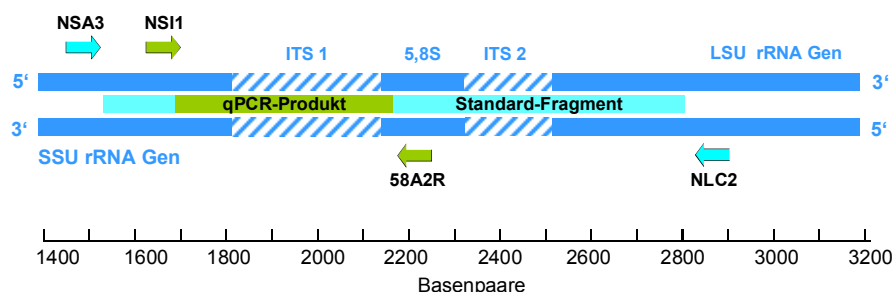


Abb. 10 Darstellung der amplifizierten DNA-Abschnitte für den qPCR-Standard und bei der qPCR am Beispiel der *Fungi*. Die Pfeile markieren die jeweilige Primerposition.

Tab. 8 Primerpaare für PCR-Reaktionen zur Herstellung der qPCR-Standards.

Primer	Ziel	<i>E. coli</i> -Position (16S rRNA-Gen)	Sequenz (5' - 3')	Referenz
F27	<i>Bacteria</i>	8-27	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Lane 1991
1391R	<i>Bacteria</i>	1391 - 1406	ACG GGC GGT GTG TAC A	Blackwood <i>et al.</i> 2005
A109f	<i>Archaea</i>	109 - 125	ACK GCT CAG TAA CAC GT	Grosskopf <i>et al.</i> 1998
Ar1384r	<i>Archaea</i>	1384 - 1401	CGG TGT GTG CAA GGA GCA	Lueders <i>et al.</i> 2004
NSA3	<i>Fungi (Dikarya)</i>	-	AAA CTC TGT CGT GCT GGG GAT A	Martin & Rygiewicz 2005
NLC2	<i>Fungi (Dikarya)</i>	-	GAG CTG CAT TCC CAA ACA ACT C	Martin & Rygiewicz 2005

Tab. 9 Ansätze für PCR-Reaktionen zur Herstellung der qPCR-Standards.

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen (µl)		
			<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Fungi</i>
10 x Puffer	10 x	1 x	2,5	2,5	2,5
dNTPs	je 10 mM	je 0,2 µM	0,5	0,5	0,5
Vorwärtsprimer	30 µM	0,30 µM	0,25	0,25	0,25
Rückwärtsprimer	30 µM	0,30 µM	0,25	0,25	0,25
MgCl ₂	25 mM	1,25 µM	-	1,25	1,25
BSA	20 mg ml ⁻¹	1 mg ml ⁻¹	-	-	1,25
Hot Star® Taq-Polymerase	5 U µl ⁻¹	0,025 U µl ⁻¹	0,125	0,125	0,125
Bidestilliertes Wasser			20,125	19,25	16,875
Template			1	1	2
Endvolumen			25	25	25

Tab. 10 Thermocycler-Programme für PCR-Reaktionen zur Herstellung der qPCR-Standards.

	<i>Bacteria</i> (F27 / 1391R)		<i>Archaea</i> (A109f / A1384r)		<i>Fungi</i> (NSA3 / NLC2)	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Einleitende						
Denaturierung	95 °C	15 min	95 °C	15 min	95 °C	15 min
Zyklen	40		40		40	
Denaturierung	94 °C	45 s	94 °C	45 s	95 °C	45 s
Annealing	50 °C	45 s	53 °C	45 s	58 °C	45 s
Elongation	72 °C	60 s	72 °C	60 s	72 °C	60 s
Terminale						
Elongation	72 °C	5 min	72 °C	5 min	72 °C	5 min

Nach Überprüfung der Ausbeute und Fragmentlänge auf einem 1 % Agarosegel wurden die PCR-Produkte in Plasmide ligiert und in *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 2.5.9). Nach Vermehrung der Bakterien für 24 h bei 37 °C wurden die Plasmide aus diesen mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) isoliert und aufgereinigt. Die Größe der Plasmide bzw. des eingebauten Fragments wurde nachfolgend auf einem 0,8 % Agarosegel überprüft. Der korrekte Einbau des gewünschten DNA-Fragments aus den Ausgangstämmen wurde außerdem durch Sequenzierung (2.5.11) der Plasmid-Extrakte kontrolliert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration in den Extrakten mit PicoGreen® (2.5.4). Die hierbei erhaltenen Werte wurden zur Berechnung der Plasmid-Kopienzahl µL⁻¹ DNA verwendet. Hierzu diente die Formel (12). Da das Gewicht der Basen einer DNA durch (13) definiert wird, resultiert daraus (14). Die berechneten Kopienzahlen sind in Tabelle 7 dargestellt.

$$(12) \quad \frac{\text{Standard-Kopienzahl}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{DNA-Konzentration (ng} \cdot \mu\text{l}^{-1})}{\text{Gewicht (ng} \cdot \text{Kopien}^{-1})}$$

$$(13) \quad \text{Gewicht (ng} \cdot \text{Kopien}^{-1}) = \frac{\text{Fragmentlänge (bp)} \cdot 6,6 \cdot 10^{11} \text{ (ng} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ bp}^{-1})}{6,023 \cdot 10^{23} \text{ (ng} \cdot \text{mol}^{-1})}$$

$$(14) \quad \frac{\text{Standard-Kopienzahl}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{DNA-Konzentration (ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}) \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \text{ (ng} \cdot \text{mol}^{-1})}{\text{Fragmentlänge (bp)} \cdot 6,6 \cdot 10^{11} \text{ (ng} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ bp}^{-1})}$$

Die Plasmid-Extrakte wurden in 10er Schritten mit PCR-Wasser (Fluka) verdünnt, um eine Standard-Verdünnungsreihe mit Kopienzahlen im Bereich von 10^2 bis 10^7 zu erstellen. Um zusätzliche Zwischenstufen zu erhalten, wurde ein Aliquot des Standards mit 10^7 Kopien im Verhältnis 1 : 3 mit PCR-Wasser vermischt. Aus diesem Mix wurden dann weitere Verdünnungen in 10er Schritten erstellt.

2.5.5.2 Anwendung der qPCR zur Bestimmung von SSU rRNA-Genkopienzahlen in Bodenproben

Zur Bestimmung der Anzahl der Bakterien, Archaeen und Pilze in Bodenproben mit der qPCR wurden SSU rRNA-Genabschnitte mit gruppenspezifischen Primerpaaren vervielfältigt (Tab. 38, Tab. 39). Die ausgewählten Primer(paare) wurden zuvor auf die Spezifität für diese Gruppen überprüft und zum Teil angepasst (vgl. 3.3.1.1). Als Standard dienten in Plasmide eingebrachte DNA-Fragmente von *Bacillus subtilis*, *Methanobacterium oryzae* bzw. *Fusarium culmorum* (siehe vorheriger Abschnitt). Für die qPCR-Reaktionsansätze wurde ein gebrauchsfertiger Reaktionsmix, das Abgene SYBR® Green PCR Kit mit Fluorescein (ThermoFisher Scientific, Bonn, Deutschland) verwendet, in dem die Polymerase, dNTPs und der für die Quantifizierung notwendige Fluoreszenzfarbstoff (SYBR®-Green I) bereits enthalten waren. Die genaue Zusammensetzung der qPCR-Ansätze ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tab. 11 Zusammensetzung der qPCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation der *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi*.

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen (μl)		
			<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Fungi</i>
Abgene SYBR® Green PCR Kit*	2 x	1 x	12,50	12,50	12,50
Vorwärts-Primer	30 μM	0,30 μM	0,25	0,25	0,25
Rückwärts-Primer	30 μM	0,30 μM	0,25	0,25	0,25
MgCl ₂	25 mM	1,25 mM	-	1,50	1,25
BSA	10 mg l ⁻¹	2 mg l ⁻¹	-	-	5,00
Bidestilliertes Wasser			11,00	9,50	4,75
Template			1,00	1,00	1,00
Endvolumen			25,00	25,00	25,00

*enthält HotStarTaq DNA Polymerase, PCR-Puffer, dNTP Mix, SYBR Green I, ROX, Fluorescein, MgCl₂ (5 mM)

Als *Template* wurden 1 : 10 (Pilze) bzw. 1 : 100 (Bakterien, Archaeen) Verdünnungen der aufgereinigten DNA (2.5.1) in bidestilliertem Wasser eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in

96-well-Platten. Die Standard-Verdünnungsreihe wurde in zweifacher Wiederholung aufgetragen, die Proben in zwei- oder dreifacher Wiederholung. Die Reaktion und Messung erfolgte mit dem myiQ-System (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien). Nach der PCR-Reaktion wurde im gleichen Gerät eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, mit der die spezifische Produktbildung während der Reaktion überprüft wurde. Die eingesetzten Thermocycler-Programme sind in Tabelle 12 dargestellt. Die spezifische Produktbildung wurde im Anschluss außerdem über die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 2 % Agarosegel kontrolliert (2.5.3).

Tab. 12 Thermocycler-Programme für qPCR Reaktionen.

	<i>Bacteria</i> (Eub338/ Eub518)		<i>Archaea</i> (A934bf / 1119ar_m2)		<i>Fungi</i> (NSI1 / 58A2R)	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Einleitende	95 °C	15 min	95 °C	15 min	95 °C	15 min
Zyklen	40		40		40	
Denaturierung	94 °C	35 s	94 °C	35 s	94 °C	35 s
Annealing	53 °C	35 s	60 °C	35 s	52 °C	35 s
Elongation	72 °C	45 s	72 °C	45 s	72 °C	45 s
Elongation	78 °C	15 s	78 °C	15 s	78 °C	15 s
Terminale						
Elongation	72 °C	5 min	72 °C	5 min	72 °C	5 min
	Schmelzkurvenanalyse		Schmelzkurvenanalyse		Schmelzkurvenanalyse	
Denaturierung	95 °C	1 min	95 °C	1 min	95 °C	1 min
Annealing	53 °C	1 min	55 °C	1 min	52 °C	1 min
Zyklen	80		80		80	
Elongation	+0,5 °C	10 s	+0,5 °C	10 s	+0,5 °C	10 s

Berechnung der Genkopienzahlen

Zur Auswertung der qPCR-Daten wurden die iQ5 Optical System Software (Version 2.1, Bio-Rad), sowie Excel (Microsoft, Redmont, Washington), verwendet. Die ermittelten Kopienzahlen μL^{-1} *Template* wurden auf g^{-1} Boden bzw. auf g^{-1} Bodenfraktion bezogen. Hierfür wurden die anhand der Standardgeraden berechneten Ausgangswerte unter Berücksichtigung der Verdünnungen zunächst durch die ermittelten DNA-Konzentrationen dividiert, um die Kopienzahl in einem ng DNA zu bestimmen. Anschließend wurde dieser Wert mit der entsprechenden DNA-Konzentration g^{-1} Boden(fraktion) multipliziert. Zur Berechnung der Kopienzahl pro m^2 Oberfläche wurden die erhaltenen Werte zusätzlich durch die spezifische Oberfläche der Bodenfraktionen, die in einer parallelen Studie für die jeweiligen Bodenvarianten ermittelt wurden (Köhler 2010), dividiert.

2.5.6 T-RFLP (*Terminal restriction length polymorphism*)-Analysen

Um qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikroorganismen-Gemeinschaften zu untersuchen, wurde die T-RFLP-Technik angewendet. Bei dieser Methode wird zunächst ein gruppenspezifischer Abschnitt, in der Regel die SSU rRNA-Gene von Mikroorganismen (Bakterien, Archaeen, Pilze) einer Umweltprobe, in einer PCR

vervielfältigt und dann mit Restriktionsendonucleasen („Restriktionsenzymen“) Sequenz-spezifisch geschnitten. Hierdurch entstehen beim Vorliegen verschiedener DNA-Sequenzen je nach eingesetztem Enzym unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Die DNA-Fragmente können dann aufgrund ihrer Größe elektrophoretisch z. B. in Kapillaren aufgetrennt werden. Durch die Markierung eines der beiden PCR-Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff können diese Fragmente bei der Auftrennung erkannt und quantitativ erfasst werden. Durch Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Größen-Standards zu jedem Ansatz wird so die Aufzeichnung eines für jede der Umweltproben charakteristischen und untereinander vergleichbaren T-RFLP-Profiles ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden T-RFLP-Profile für Bakterien, Archaeen und Pilze erstellt. Hierfür wurden 16S bzw. 18S-ITS rRNA-Genabschnitte aus DNA-Extrakten mit universellen Primerpaaren für diese Gruppen vervielfältigt (Tab. 13). Für alle Analysen, unabhängig von den untersuchten Gruppen, wurden bis auf die Primer gleiche PCR Komponenten und das gleiche Thermocyclerprotokoll verwendet (Tab. 14, Tab. 15) Die PCR-Reaktion wurde für jede Probe dreimal wiederholt, um geringfügige Schwankungen bei der Produktbildung auszugleichen. Die parallelen Ansätze wurden vereinigt und auf einem 1 % Agarosegel überprüft.

Tab. 13 Primersysteme für die PCR-Reaktion bei der T-RFLP.

Primer	Ziel	<i>E. coli</i> -Position (16S rRNA-Gen)	Sequenz (5' - 3')	Referenz
F27*	<i>Bacteria</i>	8-27	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Lane 1991
926r	<i>Bacteria</i>	926 - 946	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	Liu et al. 1997
A364aF	<i>Archaea</i>	346 - 364	CGG GGY GCA SCA GGC GCG AA	Burggraf et al. 1997
A934bR*	<i>Archaea</i>	915 - 934	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Grosskopf et al. 1998
ITS1f*	<i>Fungi</i>	-	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	Gardes et al. 1993
ITS4r	<i>Fungi</i>	-	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al. 1990

*Fluoreszenzmarkiert mit Cy5

Tab. 14 Ansätze für die PCR-Reaktion bei der T-RFLP.

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen (µl)	
10 x Puffer	10x	1x	5	2,5
dNTPs	je 10 mM	je 0,2 µM	1	0,5
Vorwärtsprimer	50 µM	0,5 µM	0,5	0,25
Rückwärtsprimer	50 µM	0,5 µM	0,5	0,25
MgCl ₂	25 mM	0,25 µM	0,5	0,25
Hot Star Taq-Polymerase	5 U µl ⁻¹	0,025 U µl ⁻¹	0,25	0,125
Bidestilliertes Wasser			41,25	20,125
Template			1	1
Endvolumen			50	25

Tab. 15 Thermocycler-Protokoll für die PCR-Reaktion bei der T-RFLP.

	Temperatur	Zeit
Einleitende		
Denaturierung	95 °C	15 min
Zyklen	30	
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	53 °C	40 s
Elongation	72 °C	90 s
Terminale		
Elongation	72 °C	8 min

Nach Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden diese in 30 µl EB-Puffer (Qiagen) eluiert und in einem Restriktionsverdau (Inkubation mit Restriktionsenzymen und dem korrespondierenden Puffer) eingesetzt. Für die Bakterien- und Pilz-Gemeinschaften wurden jeweils drei unabhängige Profile mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen, für die Archaeen-Gemeinschaften jedoch nur ein Profil mit einem Enzym erstellt (Tab. 16). Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 17 dargestellt. Das eingesetzte *Template*-Volumen richtete sich nach der zuvor auf dem Agarosegel erkennbaren Ausbeute der PCR-Produkte. Üblicherweise wurden 10 µl verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte unabhängig vom verwendeten Restriktionsenzym (Fermentas) für 4 h bei 37 °C. Die DNA wurde im Anschluss über eine Ethanol-fällung aufgereinigt. Hierfür wurden 5 Volumen 95 % Ethanol und 3 M Natriumacetat (pH 4,6, ein Fünfzigstel des Ethanolvolumens) verwendet. Die Ansätze wurden durch vorsichtiges Invertieren gemischt und danach 30 min bei -20 °C inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 14.000 x g wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet durch Zugabe von 100 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 14.000 x g und Entfernen des Überstands wurde das Pellet luftgetrocknet. Die Proben wurden in 30 µl SLS-Puffer („Sample Loading Solution“ mit Formamid, Beckman Coulter) resuspendiert und 0,3 µl eines 600 bp Standards (Beckman Coulter) hinzugefügt. Zur elektrophoretischen Auftrennung in einem CEQ™ 8800 Kapillarsequenzierer (Beckman Coulter) wurden alle Ansätze komplett (30 µl) auf eine 96-well-Platte überführt und mit einem Tropfen Öl überschichtet.

Tab. 16 Für den Restriktionsverdau verwendete Enzyme bei der T-RFLP.

Enzym	Schnittstelle	Verwendet für
<i>Bst</i> UI (<i>Bsh</i> 1236I)	CG↓CG	<i>Archaea</i>
<i>Hae</i> III (<i>Bsu</i> RI)	GG↓CC	<i>Bacteria</i> , <i>Fungi</i>
<i>Hha</i> I	GCG↓C	<i>Bacteria</i> , <i>Fungi</i>
<i>Msp</i> I	C↓CGG	<i>Bacteria</i> , <i>Fungi</i>

Tab. 17 Ansatz für den Restriktionsverdau bei der T-RFLP.

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen (µl)
Restriktionsenzym	10 U µl ⁻¹	0,33 U µl ⁻¹	1
Puffer	10 x	1 x	3
Wasser			x
DNA-Template			x
Endvolumen			30

Auswertung der T-RFLP-Profile

Die Erstellung der T-RFLP-Profile erfolgte während der elektrophoretischen Auftrennung im Kapillarsequenzierer. Nach der Auftrennung wurden die Profile mit der CEQ™ 8800-Software (Beckman Coulter) ausgewertet. Die Profile der einzelnen Proben wurden zunächst manuell überprüft. Profile, bei denen die dominanten Fragmente eine sehr hohe oder niedrige Fluoreszenz (> 180.000 bzw. < 2.000 Einheiten) aufwiesen oder Profile bei denen der 600 bp Standard nicht oder nur unvollständig zu erkennen war, wurden von den

weiteren Analysen ausgeschlossen. Alle anderen Profile wurden nachfolgend mit Hilfe des in der Software integrierten *AFLP-Analysis Tools* ausgewertet. Als Spannweite, bei dem die Spitzen (Peaks) der DNA-Fragmente noch als unterschiedlich erkannt werden sollten, wurde dabei ein Wert von 1,5 bis 2,0 Basen gewählt. Die weitere Analyse der Daten erfolgte anhand der Peak-Höhen (*y-height*) der Fragmente. Dafür wurden die Werte aller Profile einer untersuchten Gruppe (z. B. *Bacteria*), die mit dem gleichen Enzym (z. B. *HhaI*) geschnitten wurden, exportiert und mit der Excel-Software (Microsoft) weiter bearbeitet. Die Werte wurden zunächst prozentual dargestellt, so dass die Summe der Peakhöhen in einem Profil 100 % betrug und jeder Peak einem prozentualen Anteil davon entsprach. Als nächstes wurde ein Schwellenwert eingeführt, der alle Peaks, die einen bestimmten Prozentwert unterschritten von den weiteren Analysen ausschloss. Je nach untersuchter Gruppe und Enzym wurde dabei in Abhängigkeit von der Gesamtzahl und Häufigkeit von Einzelpeaks ein Wert zwischen 0,5 und 1 % gewählt. Die Prozentwerte wurden nachfolgend auf die neue Gesamtsumme, die sich aus den verbleibenden Peaks ergab, bezogen. Die Daten wurden zur weiteren Auswertung in die Bionumerics-Software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) exportiert. Zur Darstellung der Ergebnisse in dieser Anwendung, wurden die Werte mit dem Faktor 100 multipliziert. Mit der Bionumerics-Software erfolgte die Berechnung der Ähnlichkeiten zwischen den Profilen über den Korrelationskoeffizienten nach Pearson. Dieser stellt ein Maß für den Grad eines *statistischen* linearen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen dar und gibt an wie sehr zwei Datensätze, in diesem Fall zwei T-RFLP-Profile, miteinander korrelieren. Durch eine Clusteranalyse über die UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*)-Methode wurden Bäume berechnet, die diese Ähnlichkeiten widerspiegeln. Bei den Bakterien- und Pilz-Gemeinschaften wurden bei der Erstellung der Bäume alle drei unabhängigen Profile aus dem Restriktionsverdau mit unterschiedlichen Enzymen durch die Bildung eines Mittelwertes berücksichtigt. Um die Ähnlichkeiten zwischen den Proben statistisch zu untersuchen, wurden die erstellten Ähnlichkeitsmatrizes exportiert und mit einem Permutationstest (2.6) untersucht.

2.5.7 Untersuchungen von DNA mit der *stable isotope probing* (SIP)-Technik

Um die am Abbau von Phenol und 2,4-DCP beteiligten Mikroorganismen-Gemeinschaften in den Bodenvarianten zu identifizieren, wurde die DNA mit der SIP-Technik untersucht (Dumont & Murrell 2005). Beim SIP-Verfahren werden Umweltproben mit Verbindungen, die mit stabilen schweren Isotopen (hier: ^{13}C) markiert sind, versetzt und inkubiert. Mikroorganismen, die die zugegebene Substanz als C-Quelle nutzen, reichern sich mit der Zeit an und bauen dabei den schweren Kohlenstoff auch in ihre DNA ein. Nach der Inkubation wird diese DNA dann aus den Proben extrahiert und in einer Dichtegradientenzentrifugation von der leichten DNA aus inaktiven Zellen getrennt. Nach der Fraktionierung des Gradienten und Isolierung der DNA aus den unterschiedlichen Dichte-Fraktionen werden diese z. B. nach PCR Amplifikation von 16S rRNA-Genen z. B. mit Fingerprinting-Methoden wie T-RFLP oder SSCP charakterisiert. Die gezielte Untersuchung

der Dichte-Fractionen, in denen sich die ^{13}C -markierte DNA befindet, ermöglicht auf diese Weise die Identifizierung von am Abbau der Verbindung beteiligten Mikroorganismen. In dieser Arbeit wurden die Mikroorganismen-Gemeinschaften in den Dichte-Fractionen über die SSCP-Methode (2.5.8) dargestellt und die Schadstoff-abbauenden Bakterien und Pilze in den schweren Dichte-Fractionen durch Klonierung (2.5.9) und anschließender Sequenzierung (2.5.11) identifiziert. Für eine genauere Charakterisierung der 16S rRNA-Gene aus den Phenol-abbauenden Mikroorganismen wurden außerdem Klon-Bibliotheken, die die Sequenzierung eines längeren DNA Fragments erlauben, aus schweren Dichte-Fractionen erstellt (2.5.9).

Die Phenol- und 2,4-DCP-abbauenden Mikroorganismen-Gemeinschaften wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten analysiert (Tab. 18). Die Auswahl der Zeitpunkte erfolgte dabei auf Grundlage der Ergebnisse der Abbauversuche mit ^{14}C -Markierung (vgl. 3.4.2). Hierbei wurden Inkubationszeiten gewählt, bei denen eine hohe Abbaurate der phenolischen Verbindungen festzustellen war, sowie die Zeitpunkte, nach Absinken der Abbaukurve und zu Versuchsbeginn bzw. Versuchsende. Da kein mikrobieller 2,4-DCP-Abbau bei der NIL-Variante stattfand, wurde diese Bodenvariante nur bei der Inkubation mit Phenol eingesetzt. Um zu bestätigen, dass in den schweren Fraktionen des Dichtegradienten nur ^{13}C -markierte DNA vorlag, wurden für einige Zeitpunkte außerdem Böden mit der nicht markierten Verbindung als Kontrolle inkubiert (Tab. 18).

Tab. 18 Inkubationszeiten der SIP-Versuche.

Ansätze		Phenol	2,4-DCP ^b
^{13}C -markiert	Tage	0, 1, 2, 4, 7, 14 ^a	0, 9, 14, 21
Nicht markiert (Kontrolle)	Tage	4, 7	9, 21

^a=nur bei NIL, FYM; ^b= nur bei NPK, FYM

2.5.7.1 Inkubation der Böden

Für die SIP-Inkubation mit ^{13}C -markiertem und nicht markiertem Phenol und 2,4-DCP wurden Mischproben der Bodenvarianten eingesetzt. Dafür wurden jeweils 150 g Boden der Probenquadrante (A, B, C, D) einer Parzelle gemischt und vor Versuchsbeginn für 7 Tage bei Raumtemperatur (20 °C) im Dunkeln konditioniert. Im Anschluss wurde die Bodenfeuchte bestimmt. Für jeden Untersuchungszeitpunkt, deren Auswahl in Abhängigkeit von der ermittelten Abbaudynamik (vgl. Ergebnisse 3.4.2) erfolgte, wurden 5 g (TG) der Bodenvariante in drei Wiederholungen eingesetzt. Dafür wurde der Boden in 100 ml-Schottflaschen eingewogen, tröpfchenweise mit der jeweiligen ^{13}C -Lösung oder einer nicht markierten Kontrolllösung (^{12}C -Verbindung) versetzt und durchmischt. Das zuzugebende Volumen wurde dabei so angepasst, dass nach der Zugabe eine Endkonzentration von 5 mM bezogen auf das Gesamtbodenwasser und 50 bis 55 % der max. Wasserhaltekapazität (vgl. Tab. 3) in den Böden vorlag (Tab. 19). Die Inkubation erfolgte unter den bei (2.4.1) beschriebenen Bedingungen in dem gleichen geschlossenen System (Abb. 6). Da in diesen Versuchen (im Gegensatz zu den parallel laufenden Inkubationen mit ^{14}C , vgl. 2.4.1) kein Auffangen des CO_2 notwendig war, wurde das NaOH in den Reagenzgläsern durch Wasser

ersetzt, um die Durchlüftung der Proben zu kontrollieren. Um den Abbau zu beenden, wurde der Boden zu den unterschiedlichen Zeitpunkten in ein Falcon-Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Tab. 19 Zugegebene Volumina der Lösungen und daraus resultierende Bodenfeuchten und Endkonzentrationen in den Bodenvarianten bei den SIP-Abbauversuchen. Die Ausgangskonzentration der Phenol-Lösung betrug 15,2 mmol l⁻¹ bei NIL und 17,3 mmol l⁻¹ bei NPK/FYM, die der 2,4-DCP-Lösung lag bei 11,6 mmol l⁻¹.

	Variante	Zugegebenes Volumen (ml)	Bodenfeuchte vor Zugabe (%)	Bodenfeuchte nach Zugabe*	% WHK _{max} nach Zugabe	Endkonzentration nach Zugabe (mmol l ⁻¹)
¹³ C-Phenol	NIL	0,310	11,2	15,8	51	5,01
	NPK	0,275	11,9	16,0	50	5,00
	FYM	0,310	13,2	17,6	51	5,03
¹³ C-2,4-DCP	NIL*	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
	NPK	0,403	9,9	16,2	51	5,03
	FYM	0,395	11,6	18,7	54	5,01

*= kein biologischer Abbau bei der NIL-Variante im ¹⁴C-Versuch erkennbar, daher hier nicht bearbeitet

2.5.7.2 Dichtegradientenzentrifugation

Kalibrierung des Dichtegradienten

Da die Dichte von Gradientenfraktionen später indirekt über den Brechungsindex ermittelt werden sollte, war es notwendig, die Korrelation zwischen diesen beiden Parametern zu bestimmen. Daher wurden unterschiedliche Mischungen der CsCl- und Puffer-Lösung erstellt und Dichte und Brechungsindex in den Gemischen bestimmt. Zur Berechnung der Dichte wurde jeweils 1 ml der Gemische in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gewogen. Die Masse entsprach in diesem Fall dann der Dichte:

$$(15) \quad \rho = \frac{m}{V} = \frac{m}{1} = m$$

Der Brechungsindex wurde in denselben Proben mit einem Refraktometer Ar200 (Reichert, Depew, New York) gemessen (Tab. 20). Anhand der ermittelten Werte wurde eine Kalibriergerade erstellt, mit der die Dichte in den Gradientenfraktionen über den Brechungsindex berechnet werden konnte (Abb. 11).

Tab. 20 Dichte und Brechungsindex von Mischungen aus den Gradientenlösungen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Wiederholungen.

CsCl-Lösung (ml)	Wässrige Puffer-Lösung (ml)	Dichte (g ml ⁻¹)	Brechungsindex bei 20 °C
1	0	1,8202	1,4134
0,9	0,1	1,7358	1,4063
0,8	0,2	1,6546	1,3989
0,7	0,3	1,5774	1,3916
0,6	0,4	1,5041	1,3846
0,5	0,5	1,4227	1,3770

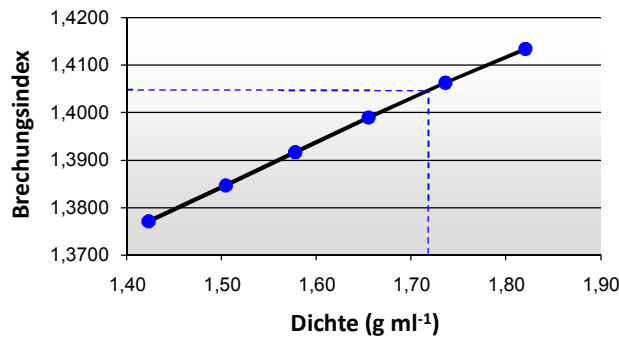


Abb. 11 Kalibriergerade zur Berechnung der Dichte in SIP-Gradientenfraktionen (abgeleitet aus Tab. 20).

Um eine bestmögliche Auftrennung von nicht markierter und ^{13}C -markierter DNA im CsCl-Dichtegradienten zu erreichen, muss in dem Ausgangsgradienten eine Dichte von $1,72 \text{ g ml}^{-1}$ vorliegen, da dies dem Bereich entspricht, in dem sich während der Zentrifugation die schwere DNA anreichert. Anhand der für die CsCl-Lösung ermittelten Dichte von $1,82 \text{ g ml}^{-1}$ und einem angenommenen Wert von $1,00 \text{ g ml}^{-1}$ für die wässrige Puffer- und DNA-Lösung wurde ein entsprechender Ansatz für die Gradienten berechnet (Tab. 21).

Tab. 21 Ansatz für einen CsCl-Dichtegradienten.

Komponente	Volumen (ml)
CsCl-Lösung	4,7
Gradientenpuffer	0,63
DNA-Lösung	0,02
Endvolumen	5,35

Aufbereitung der Proben für den Dichtegradienten

Aus jedem Inkubationsansatz wurden zweimal $0,5 \text{ g}$ Boden entnommen und die DNA aus diesen mit dem FastDNA Kit (MP Biomedicals) extrahiert (2.5.1). Nach Bestimmung der DNA-Konzentration (2.5.4), wurde aus den sechs Extrakten der drei Wiederholungen eine Mischprobe erstellt. Dazu wurde jeweils ein Volumen entnommen, das 600 ng DNA beinhaltete. Die Mischprobe wurde nachfolgend mit PCR-Wasser (Fluka) so verdünnt, dass in der zum Gradienten zuzugebenden Menge insgesamt wieder 600 ng DNA enthalten waren.

Erstellung des Dichtegradienten

Zur Erstellung eines Ansatzes für den Dichtegradienten wurden die CsCl- und die Puffer-Lösung in den zuvor bestimmten Volumina (Tab. 21) in ein 15 ml Falcon Röhrchen gegeben und mit 600 ng DNA beladen. Die Röhrchen wurden kurz geschwenkt und die Dichte der Lösung durch Messung des Brechungsindex überprüft. Wenn diese bei den gewünschten $1,72 \text{ g ml}^{-1}$ lag, wurden 5 ml der Mischung mit einer Spritze in Opti-Seal tubes (Beckman Coulter) luftblasenfrei gemäß Herstellerangaben überführt. Danach wurden die Gefäße auf einer Feinwaage paarweise zueinander austariert ($\Delta = 0,001 \text{ g}$) und verschlossen.

Die Zentrifugation erfolgte für mindestens 40 h bei $42.000 \text{ U min}^{-1}$ und 20°C in einer OptimaTM L-100 XP Ultrazentrifuge (Vertikalrotor VTI 65.1, Beckman Coulter).

Fraktionierung des Dichtegradienten

Um Gradientenfraktionen mit unterschiedlicher Dichte zu erhalten, wurden die Opti-Seal tubes nach der Zentrifugation senkrecht an einem Stativ befestigt und am oberen und unteren Ende mit einer Kanüle ($\varnothing 0,45 \text{ mm}$) eingestochen. Durch die obere Öffnung wurde mit einer Schlauchpumpe LK B (Produk AB, Schweden) destilliertes Wasser über die Kanüle hineingepumpt. Die heraustropfende Gradientenlösung wurde in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit bekanntem Gewicht aufgefangen. Das Gefäß wurde dabei alle 20 s gewechselt, so dass am Ende Gradientenfraktionen mit unterschiedlicher Dichte vorlagen. Um das Ende des Gradienten zu erkennen, wurde das hineingeleitete destillierte Wasser mit Bromphenolblau angefärbt. Im Anschluss wurden Masse und Brechungsindex in den Gradientenfraktionen bestimmt. Anhand des Brechungsindex und der zuvor erstellten Kalibriergeraden wurde die Dichte in den Fraktionen überprüft, die bei einer erfolgreichen Auftrennung einen linearen Verlauf aufwies (Abb. 12). Über Masse und Dichte konnte auf das vorliegende Volumen in den Gefäßen geschlossen werden.

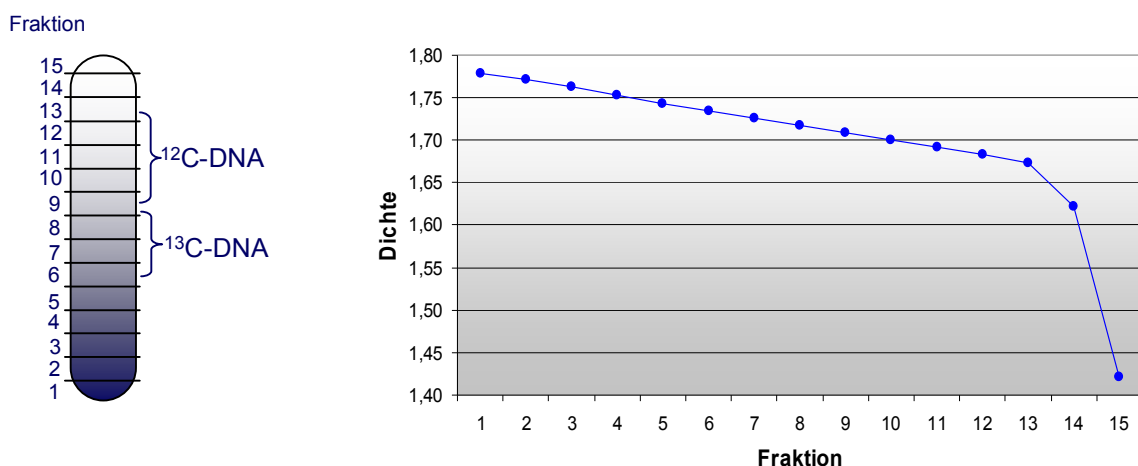


Abb. 12 Fraktionierung eines Dichtegradienten (Schema) und Beispiel eines linearen Dichte-Verlaufs.

Fällung der DNA aus den Dichtegradientenfraktionen

Um die DNA aus den Gradientenfraktionen zu gewinnen, wurden diese zunächst mit 2 Volumen Polyethylenglykol-Lösung versetzt, kurz auf einem Vortex VF2 (IKA, Staufen, Deutschland) durchmischt und im Anschluss für 30 min bei $13.000 \text{ U min}^{-1}$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit $150 \mu\text{l}$ 70 % Ethanol gewaschen. Zur Entfernung des Ethanols wurde nach 5 min Zentrifugation bei $13.000 \text{ U min}^{-1}$ bei Raumtemperatur in einer 4K10 Zentrifuge der Überstand abpipettiert. Im Anschluss wurde das Pellet in $30 \mu\text{l}$ Elutionspuffer (Qiagen) gelöst. Nach 1 min Schütteln bei 1.400 U min^{-1} und 30°C in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), wurden die Proben kurz abzentrifugiert und die Lösungen in zwei frische Gefäße überführt. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.5.8 SSCP (*Single strand conformation polymorphism*)

Um die Mikroorganismen-Gemeinschaften in den SIP-Gradientenfraktionen qualitativ darzustellen, wurden mit Hilfe der SSCP-Technik genetische DNA-Profile erstellt. Das Prinzip dieser Methode beruht dabei auf der elektrophoretischen Auftrennung von einzelsträngiger DNA in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel (Dohrmann & Tebbe 2005). Zunächst wird der gewünschte DNA-Abschnitt in einer PCR (2.5.2) vervielfältigt, wobei einer der eingesetzten Primer phosphoryliert ist. Um einzelsträngige DNA zu erhalten wird der phosphorylierte DNA-Strang der PCR-Produkte anschließend mit einer λ -Exonuclease enzymatisch abgebaut (Schwieger & Tebbe 1998). Im Anschluss erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Einzelstränge auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel. Da die PCR-Produkte eine identische Größe besitzen, erfolgt die Auftrennung dabei anhand ihrer Basenabfolge. In Abhängigkeit der vorliegenden Mikroorganismen-Gemeinschaften entsteht auf diese Weise für jede Probe ein charakteristisches Bandenmuster (DNA-Fingerprint). Die Diversität der Mikroorganismen in den Dichte-Fractionen wurde in dieser Arbeit über PCR-Amplifikation von Bakterien- bzw. Pilz-spezifischen 16S rRNA bzw. 18S-ITS rRNA-Genen charakterisiert. Die dafür verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tab. 22 Primerpaare für die SSCP-PCR Reaktionen.

Primer	Ziel	<i>E. coli</i> -Position	Sequenz (5' - 3')	Referenz
Com 1	<i>Bacteria</i>	519 - 536	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	Schwieger & Tebbe 1998
Com 2*	<i>Bacteria</i>	907 - 926	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	Schwieger & Tebbe 1998
NSI1	<i>Fungi (Dikarya)</i>	-	GAT TGA ATG GCT TAG TGA GG	Martin & Rygiewicz 2005
58A2R*	<i>Fungi (Dikarya)</i>	-	CTG CGT TCT TCA TCG AT	Martin & Rygiewicz 2005

*= phosphorylierter Primer

Die Profile wurden im Wesentlichen wie bei Dohrmann & Tebbe (2005) beschrieben hergestellt. Die DNA wurde unverdünnt in drei unabhängigen Wiederholungen in der PCR-Reaktion eingesetzt. Die Ansätze wurden danach zu einer Mischprobe vereinigt und auf einem Agarosegel überprüft. Die Zusammensetzung der für die PCR verwendeten Reaktions-Ansätze und die Thermocycler-Programme sind in den Tabellen 23 und 24 dargestellt. Die PCR-Produkte wurden nachfolgend mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 50 μ l EB-Puffer (Qiagen) überführt.

Tab. 23 Ansatz für PCR-Reaktionen mit SSCP-Primern.

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen (μ L)
PCR-Puffer	10 x	1 x	5
dNTP Mix	je 10 mM	je 0,2 mM	1
Vorwärts-Primer	50 μ M	0,5 μ M	0,5
Rückwärts-Primer	50 μ M	0,5 μ M	0,5
HotStarTaq® DNA-Polymerase	5 U / μ L	0,025 U / μ L	0,25
Bidestilliertes Wasser			41,75
Template DNA			1
Endvolumen			50

Tab. 24 Thermocycler-Programme für SSCP-PCR Reaktionen.

Primerpaar	<i>Bacteria</i>		<i>Fungi</i>	
	Com1 / Com2-ph		NSI1 / 58A2R-ph	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Einleitende				
Denaturierung	95 °C	15 min	95 °C	15 min
Zyklen	30		30	
Denaturierung	94 °C	60 s	94 °C	45 s
Annealing	50 °C	60 s	56 °C	45 s
Elongation	72 °C	70 s	72 °C	60 s
Terminale				
Elongation	72 °C	5 min	72 °C	5 min

Einzelstrangverdau

Zur Erstellung von einzelsträngiger DNA wurden jeweils 25 µl der PCR-Produkte mit λ-Exonuclease (New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland) versetzt. Dafür wurde zu jeder Probe ein äquivalentes Volumen eines Reaktionsansatzes bestehend aus dem Enzym, Enzym-Puffer und Wasser gegeben (Tab. 25).

Tab. 25 Ansatz für den enzymatischen Einzelstrangverdau.

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen (µl)
<i>Exonuclease-Puffer</i>	10 x	1 x	4
<i>λ-Exonuclease</i>	5 U µl ⁻¹	0,0625 U µl ⁻¹	0,5
<i>Bidestilliertes Wasser</i>			9,5
<i>Template (PCR-Produkte)</i>			25*
Endvolumen			40

*=beim SSCP-Marker und PCR-Produkten aus *E. coli*-Klonen wurden 14 µl *Template* verwendet

Der enzymatische Einzelstrangverdau erfolgte für 45 min bei 37 °C in einem Thermomixer (Eppendorf). Die Ansätze wurden zu Beginn für 20 s bei 650 U min⁻¹ geschüttelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Proben mit 5 Volumen PB-Puffer (Qiagen) versetzt. Danach wurden diese mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und in 10 µl EB-Puffer (Qiagen) eluiert. Das Eluat wurde mit 9 µl SSCP-Ladepuffer versetzt und bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der einzelsträngigen DNA-Fragmente dienten Polyacrylamidgele (Tab. 26). Die Gel-Lösung wurde vor Zugabe der Katalysatoren TEMED und APS filtriert und entgast. Zur Fixierung des Gels wurden eine Glasplatte, sowie eine Thermostatikplatte verwendet. Die Glasplatte wurde mit 1 ml verdünnter PlusOne™ Bind Silane-Lösung (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien), die Thermostatikplatte mit 1 ml PlusOne™ Repel Silane ES (GE Healthcare) behandelt. Die Platten wurden auf *Spacern* übereinander platziert und mit Klammern fixiert. Nach dem Gießen des Gels erfolgte eine Polymerisation für mindestens 135 min.

Tab. 26 Zusammensetzung eines Polyacrylamid-Gels zur Auftrennung von einzelsträngigen DNA-Fragmenten bei der SSCP.

Komponente	Volumen
2x MDE®-Lösung (Lonza, Basel, Schweiz)	7,8 ml
10 x TBE-Puffer	2,5 ml
Destilliertes Wasser	14,7 ml
40 % APS	25 µl
TEMED	10 µl

Unmittelbar vor dem Auftragen erfolgte eine Denaturierung der Proben für 2 min bei 95 °C in einem Thermomixer und eine nachfolgende Lagerung auf Eis für mindestens 3 min. Auf das Gel wurden maximal 7 µl (Kamm für 24 Proben) bzw. 6 µl (Kamm für 36 Proben) der Proben aufgetragen. Um die SSCP-Gele untereinander vergleichen zu können, wurden zusätzlich 1,5 bis 2 µl eines DNA-Markers aufgetragen. Dieser setzte sich aus mit Com1 und Com2 (phosphoryliert) Primern erzeugten 16S rRNA-Genfragmenten von genomischer DNA aus Reinkulturen von *Bacillus licheniformis*, *Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium johnsoniae* und *Rhizobium radiobacter* zusammen. Vor dem Auftragen wurde der Marker zusammen mit den Proben in dem Einzelstrangverdau eingesetzt und äquivalent weiterbehandelt. Die elektrophoretische Auftrennung der Einzelstränge erfolgte für 17 h (Bakterien-Profile) oder 14 h (Pilz-Profile) bei 400 V, maximal 20 mA und 12 W bei 20 °C. Die Elektrophorese wurde in einer 2010 Macrophor Electrophoresis Unit (Amersham-Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Deutschland) mit 1x TBE als Lauf-Puffer durchgeführt. Zur Aufrechterhaltung der konstanten Temperatur von 20 °C wurde die Thermostatikplatte an ein temperierbares Wasserzirkulationssystem angeschlossen.

Silbernitratfärbung

Um die auf dem Gel aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde eine Silbernitratfärbung durchgeführt (Bassam *et al.* 1991). Dafür wurde das auf der Glasplatte fixierte Gel zunächst für 30 min in 10 % Essigsäure auf einem Schüttler geschwenkt. Direkt im Anschluss wurde die Glasplatte dreimal für 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Nach Zugabe der Färbelösung erfolgte eine 30 min Inkubation im Dunkeln auf dem Schüttler. Im Anschluss wurde das Gel auf der Glasplatte für 1 min 20 sec in destilliertem Wasser gewaschen und dann kalte Entwicklerlösung (4 °C) hinzugegeben. Die Entwicklung fand bis zur gewünschten Farbintensität statt und wurde zu einem günstig erscheinenden Zeitpunkt in 10 % Essigsäure abgestoppt. Nach 3 min wurde das Gel in destilliertem Wasser überführt und dort anschließend für 30 bis 60 min aufbewahrt. Das Gel wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und danach mit einem Durchlicht-Scanner (HP) digitalisiert.

2.5.9 Klonierung

Zur weiteren Charakterisierung von Mikroorganismen wurden die aus DNA-Lösungen amplifizierten PCR-Produkte bei einzelnen Untersuchungen auch kloniert und sequenziert. Bei dieser Methode wird ein DNA-Fragment über eine Ligation in ein Plasmid eingebracht

und nachfolgend in das Bakterium *E. coli* transformiert. Da dieses Bakterium eine hohe Wachstumsrate aufweist und bei seiner Reproduktion auch die Plasmide vermehrt werden, kann so in relativ kurzer Zeit eine Vielzahl identischer Klone mit diesem Plasmid erzeugt werden. Die Plasmide können dann aus den Bakterien extrahiert (2.5.10) und ihre klonierten, eingefügten DNA-Abschnitte sequenziert werden (2.5.11). In dieser Arbeit wurde die Klonierung dazu verwendet, SSCP-Banden bzw. DNA-Fragmente aus SIP-Gradienten zu sequenzieren. Außerdem wurden Klonierungen von rRNA-Genen, die als Standards für die qPCR dienten, durchgeführt (vgl. 2.5.5.1).

Ligation

Zum Einbau der DNA-Fragmente in Plasmide wurde das pGEM®-T Vektor System II (Promega, Madison, Wisconsin) nach Herstellerangaben verwendet. Die Zusammensetzung eines Ligationsansatzes ist Tabelle 27 zu entnehmen. Die Ligation der PCR-Produkte erfolgte bei 4 °C über Nacht. In einem weiteren Ansatz wurde ein Fragment des Herstellers als Positivkontrolle ligiert.

Tab. 27 Ligationsansatz für das pGEM®-T Vektor System II.

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen (µl)
2x Rapid Ligationspuffer	2 x	1 x	2,5
pGEM®-T Vektor	50 ng µl ⁻¹	5 ng µl ⁻¹	0,5
T4 DNA Ligase	3 Weiss U µl ⁻¹	0,3 Weiss U µl ⁻¹	0,5
PCR-Produkt			1,5
Endvolumen			5,0

Transformation

Die Plasmide wurden in kompetente JM 109 *Escherichia coli*-Zellen (Promega) transformiert. Hierfür wurden jeweils 1,7 µl eines Ligationsansatzes zu 30 µl der kompetenten Zellen gegeben und nachfolgend für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 s bei 42 °C im Thermomixer hitzegeschockt und dann für weitere 2 min auf Eis gelagert. Nach der Zugabe von je 570 µl raumtemperiertem SOC-Medium zu den Ansätzen fand eine 90 min Inkubation bei 37 °C und 600 U min⁻¹ statt. Jeweils 100 µl der Ansätze wurden auf LAXI-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kontrolle der Ligation und Transformation erfolgte über eine Blau-Weiß-Selektion. Diese basiert darauf, dass nur bei einem intakten Plasmid ohne eingebautes DNA-Fragment ein Enzym gebildet wird, das eine im LAXI-Medium enthaltene organische Verbindung (X-Gal) spaltet und so einen blauen Farbstoff in den *E. coli*-Zellen freisetzt. Bei einer erfolgreichen Ligation eines DNA-Fragments in den Vektor erscheinen die entsprechenden Bakterienkolonien dagegen weiß. Nach der Inkubation im Brutschrank wurden die Platten daher auf weiße und blaue Kolonien überprüft. Von jeder Probe wurden 8 bis 10 weiße Kolonien ausgewählt und auf neue LAXI-Platten ausgestrichen. Zur Vermehrung der Klone wurden diese über Nacht bei 37 °C oder für 72 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurde die Färbung der gewachsenen Bakterien-Kolonien überprüft und die Platten bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4 bis 8 °C aufbewahrt.

2.5.10 Plasmid-Präparation

Zur Plasmid-Präparation wurden von den gewünschten Proben Klone ausgewählt und aus diesen Flüssigkulturen angelegt. Dafür wurde jeweils 5 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium in Reagenzgläsern oder Plastikkulturröhrchen mit den Bakterien beimpft und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Von diesen Übernacht-Kulturen wurden dann 3 ml entnommen und daraus die Plasmide mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerangaben extrahiert. Die extrahierten Plasmide wurden im Anschluss auf einem 0,8 % Agarosegel auf eine korrekte Laufhöhe überprüft (2.5.3).

2.5.11 Sequenzierung

Durch Sequenzierung kann die Basenabfolge einer DNA bzw. eines DNA-Abschnitts bestimmt werden. Durch den Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit denen in rRNA-Datenbanken (z. B. NCBI und RDP) können anhand der Ähnlichkeiten nachfolgend Aussagen über bestimmte Eigenschaften der Mikroorganismen, aus denen die DNA ursprünglich stammt, getroffen werden. So kann z. B. mit Hilfe phylogenetischer Analysen ihre Verwandtschaft zu anderen Mikroorganismen betrachtet werden. Neben Weiterentwicklungen der klassischen Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.* 1978) werden hierfür heute zunehmend neuere Verfahren („Next-Generation-Sequencing“) eingesetzt, die einen erhöhten Proben-Durchsatz erlauben (Pettersson *et al.* 2009). In dieser Arbeit wurde die Sequenzierung dazu verwendet, Mikroorganismen, die am Abbau von Phenol und 2,4-DCP beteiligt waren, anhand ihrer rRNA-Gene zu identifizieren. Auch bei der Überprüfung von Primerspezifitäten wurde die Sequenzierung angewendet. Die Sequenzierreaktionen wurden dabei von der Firma GATC-Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

2.5.11.1 Aufarbeitung von DNA aus SSCP-Banden für die Sequenzierung

Um die Mikroorganismen zu identifizieren, die nach der Inkubation mit ^{13}C -Verbindungen SSCP-Banden in schweren Dichtefractionen ausbildeten (2.5.7), wurde ihre DNA untersucht. Dazu wurden die Banden mit einem Skalpell aus den SSCP-Gelen ausgeschnitten und in einem Reaktionsgefäß mit 50 μl „Crush and Soak“-Puffer versetzt. Um die DNA zu eluieren, erfolgte eine 3 h Inkubation bei 550 U min^{-1} und 37 °C in einem Thermomixer. Im Anschluss wurden 40 μl aus der Lösung entnommen und in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 2 Volumen 96 % Ethanol wurde die DNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Danach wurden die Proben für 25 min bei 13.000 U min^{-1} und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 10 min bei 37 °C im Thermomixer getrocknet und anschließend in 12 μl 10 mM Tris-Puffer resuspendiert. Die erhaltene DNA wurde in einer PCR mit den entsprechenden SSCP-Primern (Tab. 22) vervielfältigt. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel überprüft und mit dem NucleoSpin® Extract Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die PCR-Produkte wurden

anschließend wie zuvor beschrieben in Plasmide eingebaut, die in *E. coli*-Zellen transformiert und vervielfältigt wurden (2.5.9).

Um sicherzustellen, dass die gewünschten DNA-Fragmente in die Plasmide eingebaut wurden, wurde ihre Laufhöhe auf SSCP-Gelen mit denen der Ausgangsprobe verglichen. Hierfür wurden für jedes DNA-Fragment drei Klone ausgewählt und mit einem Zahnstocher ein Abstrich entnommen. Zur schnellen Gewinnung der Plasmide („Schnelllysis“) wurde dieser zu jeweils 50 µl Lysispuffer gegeben und für 15 min bei 600 U min⁻¹ und 95 °C im Thermomixer inkubiert. Nach der Zugabe von 450 µl bidestilliertem Wasser wurden die Proben homogenisiert und für 4 min bei 10.000 U min⁻¹ zentrifugiert. Jeweils 1 µl des Überstands diente als *Template* für eine PCR, die mit den entsprechenden SSCP-Primerpaaren durchgeführt wurde (Tab. 22). Die weitere Aufarbeitung der Proben und die Erstellung der SSCP-Profile erfolgte wie zuvor beschrieben (2.5.8). Zusätzlich zu den PCR-Produkten der drei Klone wurde die Ausgangsprobe des Profils, aus dem die Bande ausgeschnitten wurde, mit auf das Gel aufgetragen. Die Bandenpositionen der PCR-Produkte auf dem SSCP-Gel wurden dann mit der Position der ursprünglich ausgeschnittenen Banden verglichen. Korrekt eingebaute DNA-Fragmente wiesen hierbei eine identische Laufhöhe mit der Bande aus der Ausgangsprobe auf. Daher wurde nachfolgend von jeder Probe ein Klon ausgewählt, dessen Laufhöhe mit der ursprünglich ausgeschnittenen Bande übereinstimmte. Von diesen Klonen wurden Flüssigkulturen angelegt, um aus diesen nachfolgend die Plasmide zu extrahieren (2.5.10). Die Plasmide wurden an die Firma GATC-Biotech (Konstanz, Deutschland) zur Sequenzierung geschickt.

2.5.11.2 Erstellung von Klon-Bibliotheken

Für einen detaillierteren Vergleich der am Phenol-Abbau beteiligten Mikroorganismen wurden Klon-Bibliotheken erstellt. Hierfür wurde DNA aus SIP-Gradientenfraktionen mit einer Dichte um 1,72 g ml⁻¹ mit universellen Primerpaaren vervielfältigt. Zur Amplifikation von bakterieller DNA wurde das zuvor bei der SSCP benutzte Primerpaar Com1/Com2 (ohne Phosphorylierung) verwendet, für die Pilz-DNA kam das Primerpaar ITS1f/ITS4r (vgl. Tab. 55) zum Einsatz. Die PCR-Reaktionen wurden unter den zuvor beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden nachfolgend auf einem 1 % Agarosegel überprüft und danach mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte wie zuvor beschrieben in Plasmide inseriert, in *E. coli* transformiert und in diesen vermehrt (2.5.9). Von den erhaltenen Klonen wurden für jede Bodenvariante 50 weiße Kolonien zufällig ausgewählt, und mit diesen jeweils ein *well* mit LB-Medium in 96er-*well* Platten beimpft. Diese Platten wurden mit einer Folie abgeklebt und zur Plasmid-Extraktion und Sequenzierung an die Firma GATC-Biotech (Konstanz, Deutschland) geschickt.

2.5.11.3 Phylogenetische Analyse der DNA-Sequenzen

Die von GATC-Biotech erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Hilfe der Software Mega4 (Tamura *et al.* 2007) überprüft und weiterbearbeitet. Die DNA-Sequenzen des Plasmids wurden dabei entfernt und alle Sequenzen in „Vorwärts“-Richtung (5' - 3' Ende der DNA) angeordnet. Mit der Software GATC-Viewer (GATC-Biotech) wurden in den Sequenzen vorliegende „unsichere“ Basen (z. B. Ns) anhand der von der Firma mitgelieferten Sequenzierprofile überprüft und die Sequenzen gegebenenfalls in Mega4 manuell korrigiert. Die Sequenzen wurden nachfolgend mit dem Programm Pintail auf chimäre DNA, d. h. Sequenzen die sich aus DNA von mehreren Mikroorganismen zusammensetzten, überprüft (Ashelford *et al.* 2005). Derartige DNA-Sequenzen wurden verworfen und von allen weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Für eine erste phylogenetische Einordnung wurden die bearbeiteten Sequenzen in eine bestehende Datenbank (ssu_jan05) der ARB-Software (Ludwig *et al.* 2004) importiert und in den enthaltenen Sequenz-Baum eingerechnet. Die Sequenzen wurden dabei anhand nah verwandter Sequenzen einander zugeordnet (aligniert). Die Zuordnung der Sequenzen wurde im Anschluss überprüft und gegebenenfalls manuell angepasst. Danach wurden die Primer-DNA-Abschnitte von den klonierten Sequenzen entfernt, die Sequenzen aus dem Baum gelöscht und nochmals neu eingerechnet. Die Sequenzen wurden in einem weiteren Schritt dann aus ARB exportiert und mit denen aus den öffentlichen Sequenzdatenbanken NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>; Cole *et al.* 2009) und ARB-Silva (www.arb-silva.de; Pruesse *et al.* 2007) verglichen. Hierzu wurde der BLAST Algorithmus (Altschul *et al.* 1990) angewendet.

Für einige der Sequenzen wurde mit Hilfe der der ARB-Software ein phylogenetischer Baum berechnet. Hierfür wurden die gewünschten DNA-Sequenzen und einige nah verwandte Sequenzen ausgewählt und mit der in ARB integrierten Tree-Builder Applikation der Baum berechnet. Hierfür wurde der AxML+ Algorithmus (Stamatakis *et al.* 2004) verwendet, der auf der Maximum-Likelihood Methode (Felsenstein 1981) beruht. Diese Methode weist gegenüber anderen Verfahren zur Erstellung von phylogenetischen Bäumen einige Vorteile, wie z. B. eine in vielen Fällen höhere Genauigkeit bei der Zuordnung von Sequenzen, auf (Whelan *et al.* 2001, Bryant *et al.* 2005).

2.6 Statistische Auswertung

Hypothesen-Tests

Die statistischen Analysen wurden mit den Programmen Sigma-Plot (Version 11, Systat Software, Chicago, Illinois) und STATISTICA (Version 5.1, StatSoft, Tulsa, Arizona) durchgeführt. Der Einfluss der unterschiedlichen Bodenvarianten und Korngrößenfraktionen wurde in den meisten Fällen über einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) untersucht. Hierzu gehörten der Vergleich der Biomasse-C-Gehalte, der DNA-Gehalte und der SSU rRNA-Genkopienzahlen in den Böden. Bei signifikanten Unterschieden wurden die

Mittelwerte im Anschluss mit dem Bonferroni t-Test paarweise verglichen, um zu klären, welche der jeweiligen Gruppen sich voneinander unterschieden. Die Auswertung der Sorptionsdaten, d. h. der Vergleich der sorbierten Mengen, sowie der K_d - und K_{oc} -Werte erfolgte dagegen ohne Durchführung einer Varianzanalyse mit dem Student-t-Test, bei dem die drei Bodenvarianten paarweise miteinander verglichen wurden. Bei allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt.

Permutationstest

Mit dem Permutationstest (Kropf *et al.* 2004) können „Fingerprints“, d. h. genetische Profile unterschiedlicher Varianten verglichen und auf signifikante Unterschiede geprüft werden. Als Ausgangswerte für diesen Test dienen dabei Ähnlichkeitswerte, wie sie z. B. in dieser Arbeit über den Korrelationskoeffizienten nach Pearson ermittelt wurden (vgl. 2.5.6). Die Prüffunktion für den Permutationstest lautet dabei:

$$(16) \quad d = \bar{r}_{\text{innerhalb}} - \bar{r}_{\text{zwischen}}$$

Hierbei ist $\bar{r}_{\text{innerhalb}}$ der Mittelwert aller Korrelationskoeffizienten innerhalb und $\bar{r}_{\text{zwischen}}$ der Mittelwert aller Korrelationskoeffizienten zwischen den untersuchten Gruppen. In dem in Tabelle 28 dargestellten Beispiel gibt es demnach insgesamt 36 Korrelationskoeffizienten innerhalb und 96 Korrelationskoeffizienten zwischen den drei untersuchten Gruppen NIL, NPK und FYM. Für die Differenz ergibt sich in diesem Beispiel:

$$(17) \quad d = 0,758 - 0,536 = 0,222$$

Die Korrelationskoeffizienten innerhalb der untersuchten Gruppen waren also größer als die zwischen den Gruppen, was auf eine höhere Ähnlichkeit der T-RFLP-Profile derselben Bodenvariante hinwies.

Tab. 28 Ähnlichkeitsmatrix der *Fungi* T-RFLP-Profile des nicht-fraktionierten Bodens. Die Korrelationskoeffizienten innerhalb der Gruppen zur Berechnung von $\bar{r}_{\text{innerhalb}}$ sind rot und fett hervorgehoben.

	NIL A	NIL B	NIL C	NIL D	NPK A	NPK B	NPK C	NPK D	FYM A	FYM B	FYM C	FYM D
NIL A	1	0,793	0,738	0,802	0,528	0,550	0,578	0,574	0,505	0,477	0,410	0,272
NIL B	0,793	1	0,740	0,818	0,468	0,552	0,604	0,570	0,470	0,495	0,422	0,267
NIL C	0,738	0,740	1	0,818	0,522	0,538	0,681	0,638	0,513	0,550	0,567	0,374
NIL D	0,802	0,818	0,818	1	0,508	0,556	0,621	0,584	0,509	0,558	0,513	0,342
NPK A	0,528	0,468	0,522	0,508	1	0,790	0,562	0,594	0,550	0,612	0,533	0,348
NPK B	0,550	0,552	0,538	0,556	0,790	1	0,706	0,703	0,612	0,731	0,637	0,419
NPK C	0,578	0,604	0,681	0,621	0,562	0,706	1	0,809	0,585	0,729	0,705	0,450
NPK D	0,574	0,570	0,638	0,584	0,594	0,703	0,809	1	0,597	0,720	0,724	0,467
FYM A	0,505	0,470	0,513	0,509	0,550	0,612	0,585	0,597	1	0,816	0,746	0,704
FYM B	0,477	0,495	0,550	0,558	0,612	0,731	0,729	0,720	0,816	1	0,910	0,768
FYM C	0,410	0,422	0,567	0,513	0,533	0,637	0,705	0,724	0,746	0,910	1	0,824
FYM D	0,272	0,267	0,374	0,342	0,348	0,419	0,450	0,467	0,704	0,768	0,824	1

Um diese Unterschiede statistisch zu überprüfen, wurde durch den Permutationstest nachfolgend die Veränderung der Differenz durch einen zufälligen Austausch von Einzelwerten (Permutation) ermittelt. Wenn die Korrelationskoeffizienten wirklich größer innerhalb als zwischen den Gruppen sind, dann führt eine Permutation zwangsläufig zu

einer Annäherung der beiden Mittelwerte und die Differenz nimmt ab. Liegen jedoch keine Unterschiede zwischen den Korrelationskoeffizienten innerhalb und zwischen den Gruppen vor, würde sich die Differenz dagegen durch eine Permutation nicht systematisch verändern. Als Ergebnis des Tests ergibt sich ein P-Wert, der den prozentualen Anteil an Permutationen angibt, die zu einer gleichen oder höheren Differenz führen. Ist dieser Wert kleiner als das gewählte Signifikanzniveau, können die Unterschiede als signifikant angesehen werden. Für das hier aufgeführte Beispiel konnten die Unterschiede zwischen den T-RFLP-Profilen der Gruppen (Bodenvarianten) auf diese Weise bestätigt werden (Tab. 29).

Tab. 29 P-Werte des Permutationstests beim Vergleich der Bodenvarianten der *Fungi* T-RFLP-Profile des nicht-fraktionierten Bodens.

Verglichene Bodenvarianten			P-Wert
Alle			0
NIL	vs.	NPK	0,029
NIL	vs.	FYM	0,028
NPK	vs.	FYM	0,028

Der Permutationstests wurde mit Hilfe eines Kommandozeilen-basierten Programms durchgeführt (Kropf *et al.* 2004). Zur Durchführung der Tests wurden die mit der Bionumerics-Software (Applied Maths) ermittelten Korrelationskoeffizienten der T-RFLP-Profile als Matrix (vgl. Tab. 28) in eine Textdatei exportiert, auf die das Programm zurückgreifen konnte. Bei dem Test wurden die einzelnen Gruppen paarweise verglichen, wobei 1.000.000 Permutationen durchgeführt wurden. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Ein Nachteil des angewendeten Permutationstests besteht allerdings darin, dass für das gewünschte Signifikanzniveau mindestens vier Proben miteinander verglichen werden müssen (Kropf *et al.* 2004). Die Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen den Korngrößenfraktionen unterschiedlicher Bodenvarianten ($n=3$) war aus diesem Grund nur eingeschränkt möglich. Ein Vergleich dieser T-RFLP-Profile mit dem Permutationstest erfolgte daher zwischen den vier Korngrößen ($> 63 \mu\text{m}$, $20-63 \mu\text{m}$, $2-20 \mu\text{m}$, $< 2 \mu\text{m}$) unabhängig von der Bodenvariante bzw. zwischen den Bodenvarianten (NIL, NPK, FYM) unabhängig von der Korngröße (siehe Tab. 57 und Tab. 58 im Anhang).

3. Ergebnisse

3.1 Bodeneigenschaften

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von unterschiedlichen organischen Kohlenstoffgehalten auf Bodenmikroorganismen und den Abbau von Schadstoffen untersucht werden. Hierzu sollten Bodenvarianten aus unterschiedlichen Langzeitdüngungen verwendet werden, da sich diese im Gehalt an organischem Kohlenstoff, nicht aber in vielen anderen Eigenschaften unterscheiden (Körschens & Pfefferkorn 1998, Körschens *et al.* 2002). Zunächst wurden daher an den aktuellen Bodenproben dieser Arbeit die Kohlenstoffgehalte der verschiedenen Bodenvarianten in Zusammenarbeit mit Anke Köhler (Köhler 2010) bestimmt, wobei zwischen dem Gesamtkohlenstoff (Gesamt-C) sowie den anorganischen (C_{anorg}), organischen (C_{org}) und mikrobiell gebundenen Anteilen (Biomasse-C) unterschieden wurde. Außerdem wurde der pH-Wert der Varianten als eine potenziell wichtige Einflussgröße für Bodenmikroorganismen und Bodenprozesse ermittelt. Die ausgewählten Varianten stammten von ungedüngten (NIL), mineralisch gedüngten (NPK) und organisch-mineralisch gedüngten (FYM) benachbarten Feldern mit gleichen Fruchtfolgen (vgl. 2.2.1).

Kohlenstoffgehalt der Bodenvarianten

Tab. 30 Gesamt-, anorganischer, organischer und mikrobiell gebundener Kohlenstoff der drei Bodenvarianten NIL, NPK und FYM. Kleine hochgestellte Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Bodenvarianten; ($n=3$).

Bodenvariante	Gesamt-C (g kg ⁻¹ Boden)*	C_{anorg} (g kg ⁻¹ Boden)*	C_{org} (g kg ⁻¹ Boden)*	Biomasse-C (mg kg ⁻¹ Boden)
NIL	17,8 ± 0,1 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	17,7 ± 0,1 ^a	128,7 ± 3,3 ^a
NPK	21,1 ± 0,2 ^b	0,06 ± 0,01 ^b	21,0 ± 0,2 ^b	163,9 ± 1,9 ^b
FYM	25,9 ± 0,4 ^c	0,07 ± 0,01 ^b	25,8 ± 0,4 ^c	264,3 ± 1,3 ^c

*=Daten aus Köhler 2010

Die Gesamt-C-, C_{org} - und Biomasse-C-Gehalte unterschieden sich signifikant voneinander. Bei der Variante ohne Düngung (NIL) waren die Kohlenstoffgehalte am niedrigsten und bei der Variante FYM am höchsten. Im Gegensatz dazu war der Gehalt an C_{anorg} , der bei den Varianten NPK und FYM etwa gleich groß war, bei der NIL-Variante signifikant höher (Tab. 30). Aufgrund des sehr geringen Anteils an C_{anorg} von 0,3 bis 0,7 % am Gesamt-C entsprachen die ermittelten Gehalte an organischem Kohlenstoff C_{org} , der den mikrobiellen Kohlenstoff einschließt, praktisch denen des Gesamtkohlenstoffs.

*pH-Werte der Bodenvarianten***Tab. 31** pH-Werte der drei Bodenvarianten NIL, NPK und FYM (gemessen in CaCl_2 , $n=3$ Wiederholungen) und Vergleich mit Literaturwerten (Körschens *et al.* 2002) und zuvor durchgeführten Messungen (R. Martens, persönliche Mitteilung).

Probennahme	NIL					NPK					FYM				
	A	B	C	D	Misch probe	A	B	C	D	Misch probe	A	B	C	D	Misch probe
April 2008	7,2	7,2	7,0	7,0	7,1	5,8	5,6	6,3	6,3	6,0	6,3	6,3	6,5	6,3	6,3
Oktober 2008	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	7,4	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	6,4	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	6,5
1997-2000*	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	6,3	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	5,7	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	6,3
Mai 2006**	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	7,5	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	6,7	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	6,5

*= Jahresmittel (Körschens *et al.* 2002); **= R. Martens persönliche Mitteilung; n. b.= nicht bestimmt

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten pH-Werte der Bodenvarianten entsprachen tendenziell denen aus anderen Untersuchungen (Tab. 31). Die nach der Probennahme im Oktober gemessenen pH-Werte der Bodenvarianten waren dabei um 0,2 bis 0,4 Einheiten höher als die der April-Probennahme. Die Werte der FYM-Variante lagen unabhängig vom Zeitpunkt der Probenahme in einem Bereich zwischen 6,3 und 6,5. Der Boden aus der NPK-Variante von einer Probenahme im Oktober wies einen ähnlichen Wert auf wie der April-Boden der gleichen Bodenvariante, der wiederum aus räumlich getrennten Feldbereichen (A, B, C, D) stammte. Die pH-Werte der Bereiche A und B, die im Vergleich zu C und D näher zueinander lagen (vgl. Abb. 4), waren dagegen bis zu 0,7 Einheiten niedriger, was auf Feldheterogenitäten hinweist. Tatsächlich wurden bereits bei früheren Beprobungen dieses Feldes räumliche Unterschiede bei den pH-Werten festgestellt (R. Martens, persönliche Mitteilung).

3.2 Anpassung einer Methode zur Fraktionierung von Böden nach ihren Korngrößen für die Untersuchung von mikrobieller DNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine auf Ultraschallbehandlung basierende Methode zur Korngrößenfraktionierung (Amelung *et al.* 1998, 1999) für die Analyse von Partikel-assoziierten Mikroorganismen und ihrer DNA angepasst. Ziel dabei war es, den Verlust der Partikel-assoziierten mikrobiellen Fraktion, gemessen als DNA bzw. durch Quantifizierung der rRNA-Gene, durch die Ultraschallbehandlung und die weitere Aufarbeitung möglichst gering zu halten. Dabei sollte gleichzeitig eine Korngrößenverteilung erreicht werden, die der etablierten Methode von Amelung *et al.* gleich oder zumindest möglichst ähnlich war.

3.2.1 Kalibrierung des Ultraschallungsgeräts

Um die zugeführte Energie nicht nur relativ sondern auch absolut erfassen zu können, wurde das Ultraschallungsgerät vor der Anwendung kalibriert. Hierfür wurde die

Ausgangsleistung des Geräts kaloriemetrisch über folgende Formel bestimmt (North 1976, Roscoe *et al.* 2000, Oorts *et al.* 2005):

$$(18) \quad P_c = \{(m_w \cdot c_w + C_{\text{Cont}}) \cdot \frac{\Delta T}{t_s}\} + H$$

P_c	= Ausgangsleistung in Watt ($\text{J} \cdot \text{s}^{-1}$)
m_w	= Masse Wasser
c_w	= spezifische Wärmekapazität des Wassers = $4,186 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
C_{Cont}	= Wärmekapazität des Gefäßes
ΔT	= Temperaturänderung
t_s	= Beschallungsdauer
H	= Wärmeverlust ($\text{J} \cdot \text{s}^{-1}$)

Zur Bestimmung des Quotienten $\Delta T/t_s$ wurden 20 g Boden mit 100 ml Wasser überschichtet und über unterschiedliche Zeiträume beschallt. Aus dem Temperaturunterschied und der Beschallungsdauer konnte dann die Temperaturänderung pro Sekunde berechnet werden. Diese lag im Mittel bei $0,158 \text{ K s}^{-1}$ (Tab. 32).

Tab. 32 Temperaturänderung (ΔT) und $\Delta T/t_s$ bei unterschiedlichen Beschallungszeiten ($n=4$).

Zeit [s]	Temperatur vorher [$^{\circ}\text{C}$]	Temperatur nachher [$^{\circ}\text{C}$]	ΔT [K]	$\Delta T/t_s$ [K s^{-1}]
60	21,20	30,78	9,58	0,160
75	22,43	34,23	11,80	0,158
90	21,63	35,88	14,25	0,159
120	21,20	39,85	18,65	0,156

Für die Berechnung der Energie, die auf die jeweiligen Bodenproben trifft, muss auch die Wärmekapazität des Becherglases (C_{Cont}), in dem sich die Bodensuspension während der Beschallung befand, bekannt sein. Hierzu wurde nach der „Mischmethode“ verfahren (Morra *et al.* 1991). Dafür wurden 50 ml Wasser in einem Becherglas auf über 50°C erhitzt und in ein zweites Becherglas mit weiteren 50 ml gegeben. Die Berechnung erfolgte dann nach:

$$(19) \quad C_{\text{Cont}} = m_1 c_w \cdot \frac{T_1 - T_2}{T_3 - T_2} - m_2 c_w$$

C_{Cont}	= Wärmekapazität des Gefäßes
$m_{1,2}$	= Masse Wasser in den Gefäßen 1 und 2
c_w	= spezifische Wärmekapazität des Wassers = $4,186 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
$T_{1,2}$	= Temperatur des Wassers der Gefäße 1 und 2 vor der Mischung
T_3	= Temperatur des Wassers im Gefäß nach der Mischung

Die Wärmekapazität des Becherglases lag unter den Versuchsbedingungen im Mittel bei $304,6 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$ mit einer Streuung von $\pm 4,9 \%$ (Tab. 33).

Tab. 33 Wärmekapazität des Becherglases (C_{Cont}) bei vier unabhängigen Messungen.

T_1 [$^{\circ}\text{C}$]	m_1 [g]	T_2 [$^{\circ}\text{C}$]	m_2 [g]	T_3 [$^{\circ}\text{C}$]	C_{Cont}
51,1	50	22,7	50	34,2	307,6
52,6	50	22,9	50	34,5	326,6
53,1	50	24,0	50	36,0	298,3
51,2	50	20,9	50	33,7	286,2

Der Wärmeverlust (H ; Gleichung (18)) wurde anhand der Abkühlungsrate von 100 ml Wasser in einem Becherglas, das zuvor durch 3 min Ultrabeschallung auf 50°C erhitzt

worden war, bestimmt. Die Temperaturabnahme wurde dabei über einen Zeitraum von 3 h verfolgt (Abb. 13).

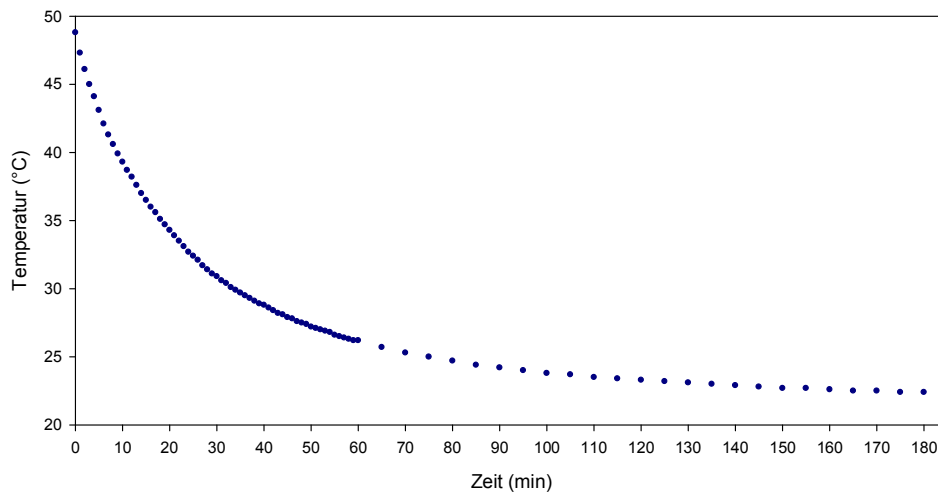


Abb. 13 Temperaturabnahme nach 3 min Ultraschallung.

Hierbei zeigte sich, dass nur sehr geringe Temperaturänderungen in dem für die Versuche relevanten Bereich (25 bis 30 °C) auftraten (Abb. 14). Da sich der Wärmeverlust H aus der Masse und der spezifischen Wärmekapazität des Wassers, sowie dem Quotienten der Temperaturänderung pro Sekunde ($\Delta T/t$) bei der Abkühlung im Bereich von 25 bis 30 °C ergibt, würde dieser unter den Versuchsbedingungen bei maximal 1 J s^{-1} liegen.

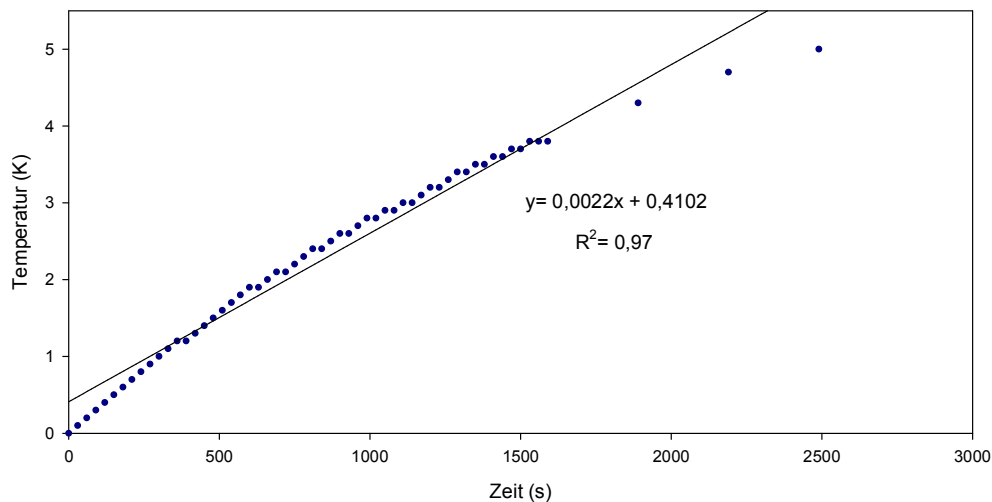


Abb. 14 Temperaturänderung im Bereich von 25 bis 30 °C abgeleitet aus Abb. 13.

Mit Hilfe der ermittelten Werte konnte über Formel (18) die Ausgangsleistung des Geräts bestimmt werden. Da der Wärmeverlust mit maximal 1 J s^{-1} sehr gering ausfiel, wurde H bei der Berechnung vernachlässigt.

Für die Ausgangsleistung ergab sich somit:

$$P_c = 100 \text{ g} \cdot 4,186 \cdot 0,158 = 66,14 \text{ J s}^{-1} \quad (\text{Wassererwärmung})$$

Eine 42 s Beschallung von 100 ml Wasser würde daher insgesamt einer Energiemenge von 2777,9 J entsprechen. Um die Wärme zu berücksichtigen, die durch das Becherglas verloren geht, wird dieser Wert um die ermittelte Wärmekapazität des Glases korrigiert:

$$2777,9 \text{ J} + 304,6 \text{ J} = 3082,5 \text{ J}$$

Durch Division durch 42 s ergibt sich daraus eine Ausgangsleistung von $73,39 \text{ J s}^{-1}$. Bei einer Beschallung von 100 ml Bodensuspension für 42 s würde also ein Energieeintrag von $30,8 \text{ J ml}^{-1}$ erfolgen.

Über die oben ermittelte Ausgangsleistung konnte mit der Formel (20) die Beschallungsdauer bestimmt werden, die für einen vorgegebenen Energieeintrag bei der Fraktionierung der Bodenproben notwendig war.

(20)

$$E_a = P_c \cdot \frac{t_s}{V}$$

E_a	= angewandte Energie ($\text{J} \cdot \text{ml}^{-1}$)
P_c	= Ausgangsleistung in Watt ($\text{J} \cdot \text{s}^{-1}$)
t_s	= Beschallungsdauer
V	= Suspensionsvolumen

z. B.

$$30 \frac{\text{J}}{\text{ml}} = 73,39 \frac{\text{J}}{\text{s}} \cdot \frac{s}{100 \text{ ml}}$$

$$\Leftrightarrow s = \frac{30}{73,39} \cdot 100 = 41 \text{ s}$$

Für einen Energieeintrag von 30 J ml^{-1} mussten demnach 20 g Boden in der vorgegebenen Suspensionslösung von 100 ml für 41 s beschallt werden. Für 10 g Boden und 50 ml Suspensionslösung betrug die Beschallungsdauer dagegen 21 s.

3.2.2 Validierung der Methode

Nach Bestimmung der Ausgangsleistung des Beschallungsgeräts, wurde die Eignung der Ultraschallbeschallungs-Methode zur Isolierung (Ablösung) und Untersuchung von DNA von den Bodenproben am Beispiel der FYM-Variante überprüft. Dafür wurden verschiedene Energieeinträge (Beschallungszeiten) getestet, nach denen jeweils die DNA-Gehalte des nicht-fraktionierten Bodens (Extraktion mit dem PowerMax Kit und Messung mit PicoGreen, vgl. 2.5.1.), der mikrobielle Biomasse-C (mit der CFE Methode, vgl. 2.3.4.2), sowie die Korngrößenverteilungen (siehe 2.2.3) bestimmt wurden. Verglichen wurden hierbei die im ursprünglichen Protokoll (Amelung *et al.* 1998) angewandten Energien mit niedrigeren, um so eine mögliche Schädigung der hochpolymeren DNA Moleküle durch Ultraschall weitestgehend zu vermeiden.

Tab. 34 Biomasse-C und DNA-Gehalte nach unterschiedlicher Beschallungsdauer von 20 g Boden der FYM-Variante (n=3).

		Unbehandelter Boden (Kontrolle)	Unbehandelte Bodensuspension (Kontrolle)	Zwei Beschallungsschritte* 1. 60 J ml ⁻¹ 2. 440 J ml ⁻¹	Einfache Beschallung 20 J ml ⁻¹
Biomasse-C	µg C g ⁻¹ Boden	273,9 ± 8,0	191,6 ± 8,6	105,7 ± 14,1	215,5 ± 13,5
DNA	µg g ⁻¹ Boden	6,65 ± 0,9	Nicht geprüft	3,71 ± 0,4	6,33 ± 0,3

* = Protokoll nach Amelung *et al.* 1998

Die Ergebnisse zeigten, dass es durch die Ultraschallbehandlung tatsächlich zu Verlusten an Biomasse kommt. Sowohl der DNA- als auch der Biomasse-C Gehalt nahmen mit zunehmender Beschallungsdauer, also mit höheren Energieeinträgen, ab (Tab. 34). Nach Beschallung mit dem auf dem ursprünglichen Protokoll basierenden Energieeintrag durch zwei Beschallungsschritte (60 und 440 J ml⁻¹), konnten 56 % des Biomasse-C im Vergleich zu einer unbehandelten Bodensuspension und 55 % der extrahierbaren DNA eines unbehandelten Bodens wiederaufgefunden werden. Durch Weglassen des zweiten Beschallungsschritts und Reduktion des Energieeintrags im ersten Schritt erhöhte sich die Wiederfindung sowohl für den Biomasse-C als auch für die DNA. Der DNA-Gehalt entsprach dabei mit 95 % Wiederauffindung dem der unbehandelten Kontrolle. Der Biomasse-C Gehalt war etwa doppelt so hoch wie nach der längeren Beschallungsdauer. Dies entsprach einer Wiederfindung von 112 % im Vergleich zur unbehandelten Bodensuspension.

Auch bei der Korngrößenverteilung war ein Einfluss der Beschallungsdauer erkennbar. So erhöhte sich der zur Tonfraktion (< 2 µm) gerechnete Anteil mit steigendem Energieeintrag. Im Gegensatz dazu blieb die Korngrößenverteilung in den übrigen Fraktionen unbeeinflusst (Tab. 35).

Tab. 35 Korngrößenverteilung nach unterschiedlicher Beschallungsdauer von 20 g Boden der FYM-Variante.

	1. 60 J ml ⁻¹ 2. 440 J ml ⁻¹	1. 20 J ml ⁻¹ 2. 110 J ml ⁻¹	20 J ml ⁻¹
Korngröße	%	%	%
> 63 µm	7,4	7,9	7,3
20-63 µm	38,8	37,1	42,1
2-20 µm	27,2	31,5	30,0
< 2 µm	26,4	23,7	20,6

Die prozentuale Erhöhung des zum Ton gerechneten Anteils bei stärkerem Energieeintrag war vermutlich auf die verbesserte Abtrennung der Tonpartikel von den größeren Partikeln der übrigen Fraktionen zurückzuführen. Die Auftrennung in Korngrößen entsprach insgesamt jedoch, unabhängig von der Beschallungsdauer, den für diese Bodenvarianten bekannten Literaturwerten. So wurden je nach angewandter Fraktionierungs-Methode Werte zwischen 21 und 26 % für die Tonfraktion beschrieben (Kandeler *et al.* 1999b; Körschens & Pfefferkorn 1998, Körschens *et al.* 2002, Vogt 2004).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden, für die weiteren Untersuchungen den Energieeintrag im ersten Schritt der Fraktionierung auf 30 J ml⁻¹ zu reduzieren und auf den

zweiten Beschallungsschritt ganz zu verzichten. Mit diesem Energieeintrag waren nur geringe Verluste an mikrobieller Biomasse und DNA verbunden, während die Korngrößenverteilung im Bereich der bekannten Literaturwerte blieb.

Um die unvermeidlichen Verluste an mikrobieller Biomasse und DNA als Folge der Ultraschallbehandlung mit 30 J ml^{-1} und der damit verbundenen Waschschrte während der Aufarbeitung quantitativ zu erfassen, wurden aus dem Waschwasser bei zwei Fraktionierungen - eine erfolgte mit der NIL, die andere mit der FYM-Variante - die DNA-Gehalte sowie die Kopienzahl der 16S rRNA-Gene der *Bacteria* bestimmt. Dafür wurden jeweils 10 g Boden fraktioniert. Während der Aufarbeitung wurden nach jedem Zentrifugationsschritt 10 ml aus der Bodensuspension entnommen und mit MgCl_2 über Nacht gefällt. Aus 250 μl des Überstands (Waschwasser) wurde dann die DNA extrahiert.

Tab. 36 DNA-Gehalte und 16S rRNA-Genkopienzahlen im Waschwasser der Bodenvarianten NIL und FYM nach den Zentrifugationsschritten bei der Korngrößenfraktionierung nach Beschallung mit 30 J ml^{-1} .

A NIL

Zentrifugationsschritt	$\mu\text{g DNA}$	16S rRNA-Genkopien
15 min I	0,45	$2,5 \cdot 10^8$
15 min II	0,49	$4,4 \cdot 10^8$
13 min I	0,01	$3,0 \cdot 10^8$
13 min II	0,29	$1,3 \cdot 10^8$
12 min I	0,32	$2,4 \cdot 10^8$
12 min II	0,57	$2,7 \cdot 10^8$
11 min I	0,46	$2,5 \cdot 10^8$
11 min II	0,51	$3,0 \cdot 10^8$
Summe	3,10	$2,2 \cdot 10^9$

B FYM

Zentrifugationsschritt	$\mu\text{g DNA}$	16S rRNA-Genkopien
15 min I	1,80	$5,3 \cdot 10^8$
15 min II	0*	$4,9 \cdot 10^8$
13 min I	0,42	$3,5 \cdot 10^8$
13 min II	0,24	$3,8 \cdot 10^8$
12 min I	0,18	$3,0 \cdot 10^8$
12 min II	0,39	$3,4 \cdot 10^8$
11 min I	0,86	$3,5 \cdot 10^8$
11 min II	0*	$3,4 \cdot 10^8$
Summe	3,91	$3,1 \cdot 10^9$

*= Messwert in den Proben kleiner oder identisch mit Blindwert

Die im Waschwasser wiedergefundenen DNA-Mengen und Kopienzahlen lagen im gleichen Bereich und zeigten keine eindeutige Zu- und Abnahme in Bezug auf die Reihenfolge der Zentrifugationsschritte. Bei der FYM-Variante (Tab. 36B) war die Summe der DNA und der Kopienzahlen aller Zentrifugationsschritte höher als bei der NIL-Variante (Tab. 36A).

Setzt man die in der Tab. 36 aufgefundenen Werte in Bezug auf die Gesamtausbeuten wie sie aus den Fraktionierungsanalysen bestimmt wurden (vgl. 3.2.3) zeigte sich, dass insgesamt nur ein geringer Teil der mikrobiellen Biomasse als Folge der Aufarbeitung

verloren ging. So fanden sich 1,1 % (NIL) bzw. 1,4 % (FYM) von der aus 10 g Boden extrahierbaren DNA (vgl. DNA-Werte in Abb. 18) nach der Aufarbeitung im Waschwasser wieder. Auch die *Bacteria* Gesamtkopienzahl, die sich im Waschwasser nachweisen ließ, war mit einer Größenordnung von 10^9 für 10 g Boden vergleichsweise niedrig. Dieser Wert entsprach 2,4 % (NIL) bzw. 1,8 % (FYM) der *Bacteria* Gesamtkopienzahlen g^{-1} Boden (vgl. Kopienzahlen in Abb. 24). Die Verteilung der Korngrößen entsprach auch bei diesen Analysen wie schon in Tabelle 35 aufgeführt wiederum den Literaturwerten, wobei hier der Tonanteil 20 % (NIL) bzw. 21 % (FYM) ausmachte. Eine Ultraschallung mit $30 J ml^{-1}$ war damit zur Korngrößenfraktionierung der ausgewählten Bodenvarianten in diesen Untersuchungen unter einem relativen guten Erhalt von deutlich über 95 % der mikrobiellen DNA sehr gut geeignet.

3.2.3 Prozentuale Verteilung der Korngrößenfraktionen bei den Bodenvarianten

Für molekularbiologische Untersuchungen der mit Korngrößenfraktionen assoziierten Mikroorganismen-Gemeinschaften wurde deren DNA gewonnen. Dazu wurden im Zuge der Fraktionierung gleiche Volumina der suspendierten Fraktionen entnommen und diese zur DNA-Extraktion verwendet (2.5.1). Die Fraktionierung wurde für jede Bodenvariante mit 20 g Boden durchgeführt und dreimal wiederholt. Zur Gewinnung der DNA und Bestimmung der Korngrößenverteilung wurde der Boden wie unter 2.5.1 beschrieben aufgearbeitet. Um einen Einfluss des pH-Wertes auf die Mikroorganismen-Gemeinschaften möglichst ausschließen zu können, wurde Bodenmaterial von den Feldbereichen „D“ der April-Probennahme verwendet, die, mit Ausnahme der NIL-Variante, durch gleiche pH-Werte charakterisiert waren (vgl. 3.1).

Tab. 37 Prozentuale Korngrößenverteilung der drei Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach der Fraktionierung zur DNA-Gewinnung (n=3).

Fraktion	NIL %	NPK %	FYM %
> 63 μm	5,8	6,3	7,8
20-63 μm	40,1	39,6	39,0
2-20 μm	31,1	34,1	30,1
< 2 μm	23,2	20,4	23,3
Summe	100,2	100,4	100,2

Die Korngrößenverteilung (Tab. 37) der aufgearbeiteten Böden entsprach den Literaturwerten für diese Varianten (Körschens & Pfefferkorn 1998, Körschens *et al.* 2002, Kahle *et al.* 2002). In allen Bodenvarianten bestand die quantitativ größte Fraktion aus Schluff (Partikelgröße zwischen 2 und 63 μm). Mit Anteilen von 69 bis 74 % zeigte sich dabei nur ein geringfügiger Unterschied zwischen den Varianten. Der Anteil der grobkörnigsten Fraktion (> 63 μm) war relativ niedrig, nahm aber mit steigendem C_{org} -Gehalt, von NIL zu FYM um ca. 34 % zu. Im Vergleich zur Beschallung nach dem Standardprotokoll von Amelung *et al.* (1998) (vgl. Tab. 35), war der prozentuale Tonanteil etwas niedriger und unterschied sich zwischen NPK (20 %) und NIL/FYM (23 %). Diese

Unterschiede aus den verschiedenen Protokollen lassen sich mit den niedrigeren Beschallungsenergien in dieser Arbeit erklären (vgl. 3.2.2).

3.2.4 DNA-Gehalte der nicht-fraktionierten Böden und der Korngrößenfraktionen

Die DNA-Gehalte in den nicht-fraktionierten Bodenvarianten zeigten eine hohe lineare Korrelation zum Kohlenstoffgehalt und zur Biomasse mit Bestimmtheitsmaßen von 0,944 bzw. 0,994 (Abb. 15).

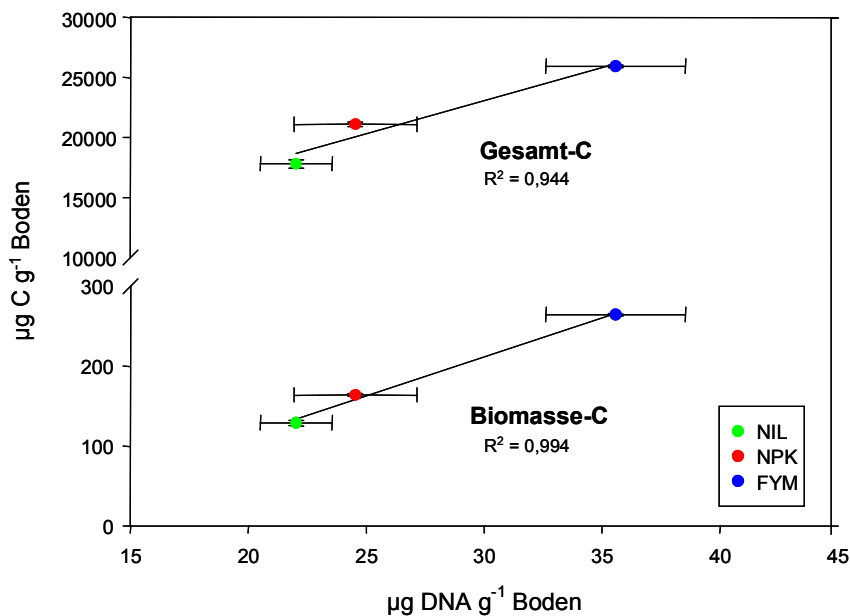


Abb. 15 Korrelationen zwischen DNA- und Kohlenstoffgehalten des nicht-fraktionierten Bodens.

Der DNA-Gehalt lag bei den Varianten NIL und NPK bei 22 und 25 $\mu\text{g g}^{-1}$ Boden, wobei sich diese Werte allerdings nicht signifikant voneinander unterschieden. Die Bodenvariante FYM (36 $\mu\text{g g}^{-1}$ Boden) wies dagegen einen signifikant höheren DNA-Gehalt als NIL/NPK auf.

Die DNA-Gehalte der einzelnen Korngrößenfraktionen korrelierten ebenfalls mit den Kohlenstoffgehalten (Abb. 16). Aufgrund der großen Streuung der extrahierten DNA-Mengen traten jedoch statistisch abgesicherte Unterschiede zwischen den Bodenvarianten nur bei den beiden gröberen Fraktionen ($> 63 \mu\text{m}$ und $20-63 \mu\text{m}$) auf. Die gedüngten Bodenvarianten (NPK, FYM) waren bei diesen Fraktionen gegenüber der NIL-Variante mit signifikant höheren DNA-Gehalten assoziiert. Der niedrigste DNA-Gehalt trat bei der $20-63 \mu\text{m}$ Fraktion (1 bis 4 $\mu\text{g g}^{-1}$) auf. Die höchsten DNA-Gehalte – im Bereich von 88 bis 147 $\mu\text{g g}^{-1}$ Fraktion – waren mit den Tonfraktionen ($< 2 \mu\text{m}$) assoziiert.

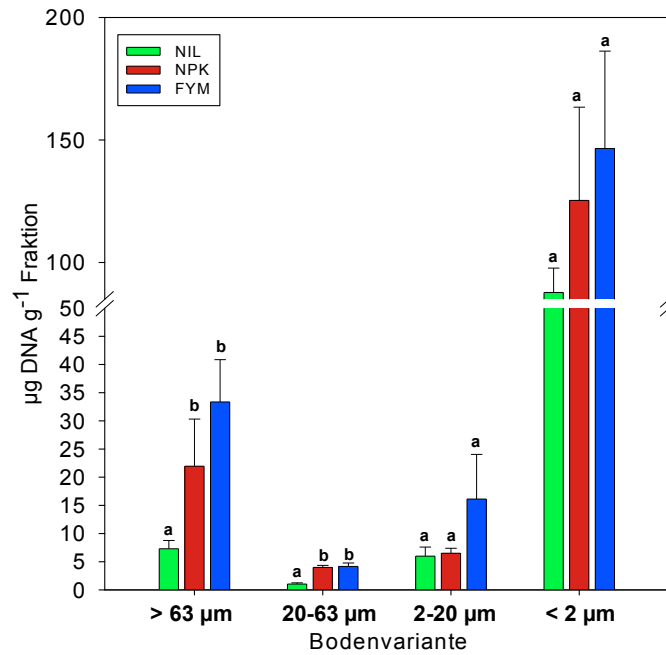


Abb. 16 DNA-Gehalte der Korngrößenfraktionen NIL, NPK und FYM (n=3). Kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Bodenvarianten.

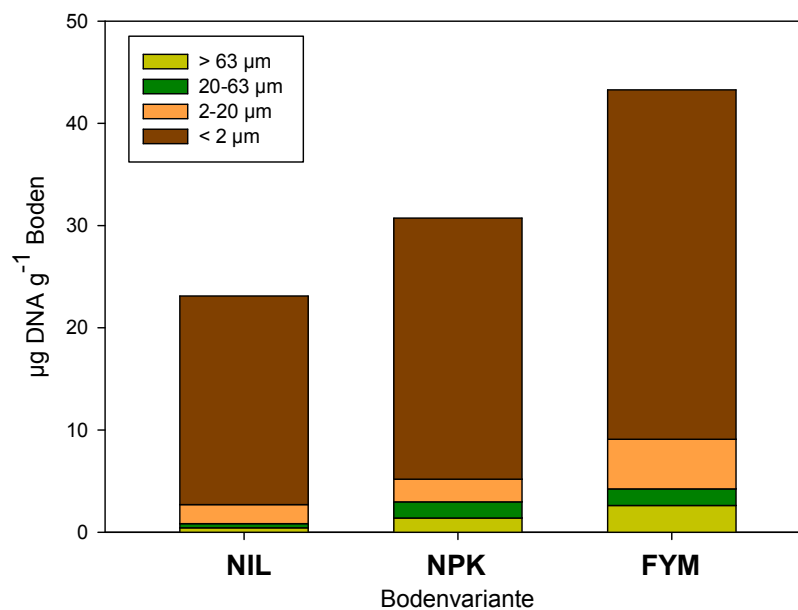


Abb. 17 DNA-Gehalte der Bodenvarianten unter Berücksichtigung der quantitativen Korngrößenverteilung (n=3).

Die mit der Tonfraktion assoziierte DNA trug unter Berücksichtigung ihres prozentualen Anteils am Gesamtboden mit 88 % (NIL), 83 % (NPK) bzw. 79 % (FYM) zum Gesamt-DNA-Gehalt der Varianten bei (Abb. 17). Der Beitrag der größeren Fraktionen (> 63 µm, 20-63 µm) lag hingegen jeweils bei nur 2 % (NIL), 5 % (NPK) und 6 bzw. 4 % (FYM).

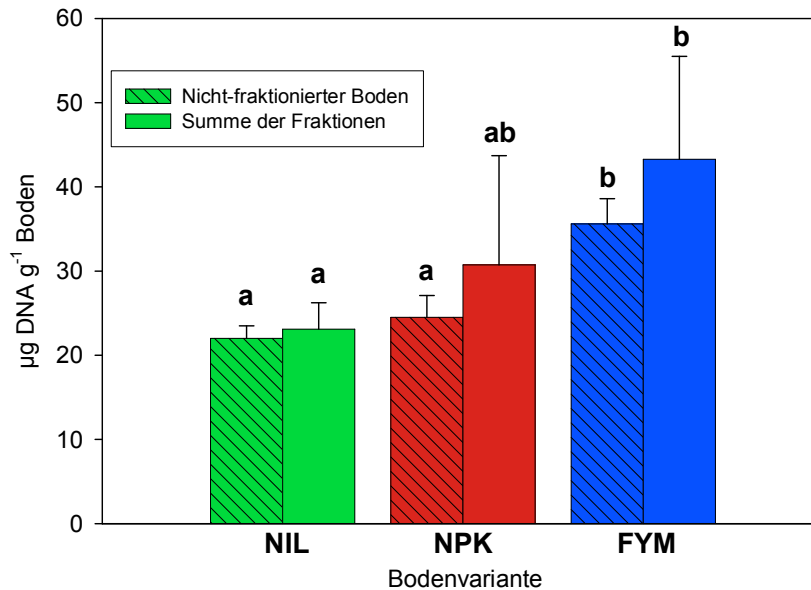


Abb. 18 Vergleich der DNA-Gehalte des nicht-fraktionierten Bodens (n=8) und der Summe der Fraktionen (n=3) der drei Bodenvarianten NIL, NPK und FYM. Kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Bodenvarianten.

Die Korrelation zwischen dem DNA-Gehalt und dem Kohlenstoffgehalt war auch in der Summe der Fraktionen jeder Variante unter Berücksichtigung der Korngrößenverteilung wieder erkennbar. So wies die FYM-Variante mit $43 \mu\text{g g}^{-1}$ einen um 86 % höheren DNA-Gehalt als die NIL-Variante ($23 \mu\text{g g}^{-1}$) auf. Die NPK-Variante lag mit $31 \mu\text{g g}^{-1}$ in ihrem DNA-Gehalt zwischen den beiden. Im Vergleich zum nicht-fraktionierten Boden, ergab die Summe der Fraktionen einen tendenziell höheren DNA-Gehalt (Abb. 18). Dies zeigte sich vor allem bei den gedüngten Varianten (NPK, FYM), die einen 1,2-fach höheren Wert zum nicht-fraktionierten Boden aufwiesen. Dies könnte an einem verbesserten Aufschluss der DNA während der Extraktion der einzelnen Korngrößenfraktionen im Vergleich zum nicht-fraktionierten Boden liegen. Aufgrund der Streuung der DNA-Gehalte des Tons innerhalb einer Variante, waren diese Unterschiede allerdings statistisch nicht abzusichern.

3.3 Abundanz und Vielfalt der mit den Korngrößenfraktionen assoziierten Mikroorganismen im Vergleich dreier Bodenvarianten

Um einen möglichen Einfluss des organischen Kohlenstoffgehalts auf die mikrobiellen Gemeinschaften zu untersuchen, wurden diese kultivierungsunabhängig über molekularbiologische Methoden auf Grundlage der rRNA-Gene näher charakterisiert. Dabei wurde die Abundanz der Bakterien, Archaeen und Pilze über qPCR und ihre Vielfalt über T-RFLP aus den DNA-Extrakten der nicht-fraktionierten Bodenvarianten NIL, NPK und FYM, sowie ihrer Korngrößenfraktionen bestimmt.

3.3.1 Quantitative PCR von SSU rRNA-Genen

3.3.1.1 Auswahl und Validierung der Primer zur Bestimmung der Populationsgrößen der Bakterien, Archaeen und Pilze

Bei der qPCR sollten Primerpaare für die PCR von rRNA-Genen aus den Gruppen *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi* eingesetzt werden. Um PCR-Systeme mit einer für Bodenuntersuchungen ausreichenden Spezifität zu finden, wurde zunächst darauf geachtet, dass die verwendeten Systeme ein möglichst kleines PCR-Produkt amplifizieren, da bei zunehmender Größe der PCR-Produkte die Effizienz der Amplifikationen und damit der Nachweise abnimmt (Smith & Osborn 2009). Von den veröffentlichten *Archaea*-Primern erfüllte kein aus der Literatur bekanntes System zu Beginn dieser Arbeiten die gewünschten Voraussetzungen: Das oft verwendete Primerpaar A364a/A934b weist ein relativ großes PCR-Produkt mit 600 bp auf. Bisherige Systeme waren vor allem für die Erfassung der Archaeen-Gemeinschaften aus anderen Umwelt-Habitaten, z. B. methanogenen, entwickelt worden (Baker *et al.* 2003). Da in Böden Archaeen aus der Abteilung der *Crenarchaeota* einen wichtigen quantitativen Anteil besitzen, wurden diese meist auf *Euryarchaeota* ausgerichteten Primer als ungeeignet betrachtet. Um möglichst viele Vertreter der im Boden vorliegenden *Crenarchaeota* zu erfassen, wurden daher neue Primer ausgewählt (Abb. 19) und auf ihre Eignung für die qPCR *in silico* und experimentell überprüft.

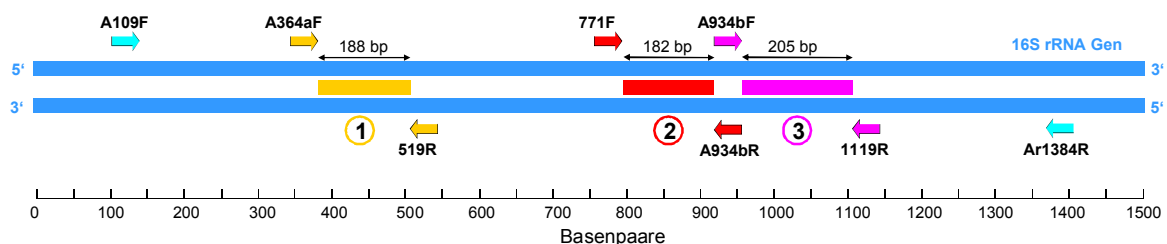


Abb. 19 Schematische Darstellung der getesteten qPCR-Primerpaare für die *Archaea* (siehe Tab. 38). Die Pfeile markieren die jeweilige Primerposition. Hellblaue Pfeile begrenzen den als qPCR-Standard verwendeten DNA-Abschnitt (vgl. 2.5.5).

Potenziell geeignete Primer wurden zunächst in der Internetdatenbank RDP (Ribosomal Database Project, release 10) sowie in ARB mit einer aktuellen ARB-SILVA-Datenbank (SSU reference database release 100) auf ihre Spezifität überprüft. Um die Anzahl der erfassten *Archaea* zu erhöhen, wurden die Sequenzen einiger Primer aus der Literatur in einzelnen Basen verändert (Tab. 38). Hierbei wurde darauf geachtet, dass Sequenzen von aus Boden isolierten *Crenarchaeota* miterfasst wurden. Eine erneute Überprüfung mit den Datenbanken ergab, dass bei einer einzelnen angenommenen Fehlpaarung (ein *missmatch*) 70 bis 80 % der *Crenarchaeota* mit den Primerpaaren 1 und 2 erfasst werden können. Mit dem dritten Primerpaar waren es nur 35 bis 38 % der Sequenzen. Dieser Unterschied ist vor allem mit den Fragmentlängen der Vergleichssequenzen erklärbar. Viele der in den angegebenen Datenbanken hinterlegten 16S rRNA-Genfragmente waren kürzer als 1.000 bp und die Sequenz des 1119R-Primers war nicht mit enthalten. In diesen Fällen konnten dann Übereinstimmungen zum Vorwärts-, nicht aber zum Rückwärtsprimer, gefunden werden.

Die tatsächliche Übereinstimmung zu *Archaea*- und *Crenarchaeota*-Sequenzen dürfte deshalb auch mit diesem Primerpaar deutlich höher liegen.

Tab. 38 Neu zusammengestellte Primerpaare für den Nachweis von *Archaea* aus Boden-DNA in der qPCR.

Nr.	Primer	Ziel	<i>E. coli</i> -Position	Sequenz (5' - 3')	Referenz
1	A364aF*	<i>Archaea</i>	346 - 364	GGG GYG CAS CAG GCG MGA A	Burggraf <i>et al.</i> 1997
	519R*	<i>Archaea</i>	515 - 533	TTA CCG CGG CGG CTG RCA C	Lam <i>et al.</i> 2007
2	771F*	<i>Crenarchaeota</i>	753 - 771	ACR GTG AGG GAY GAA AGC T	Ochsenreiter <i>et al.</i> 2003
	A934bR	<i>Archaea</i>	915 - 934	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Grosskopf <i>et al.</i> 1998
3	A934bF	<i>Archaea</i>	915 - 934	AGG AAT TGG CGG GGG AGC AC	Grosskopf <i>et al.</i> 1998
	1119R*	<i>Archaea</i>	1001 - 1119	GGY RNG GRT CTC GCT CGT T	Burggraf <i>et al.</i> 1997

*= modifiziert, Veränderungen sind durch rot und fett dargestellte Nukleotide gekennzeichnet

Um die Produktlänge und -spezifität zu überprüfen, wurden die zur Auswahl stehenden Primerpaare in einer normalen PCR eingesetzt und die Produkte auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Vorlage (*Template*) für die Reaktion dienten hierbei die zur Erstellung der Plasmid-Standards (2.5.5.1) verwendeten PCR-Produkte aus Reinkulturen, sowie DNA-Extrakte aus den verschiedenen Bodenvarianten und Korngrößenfraktionen.

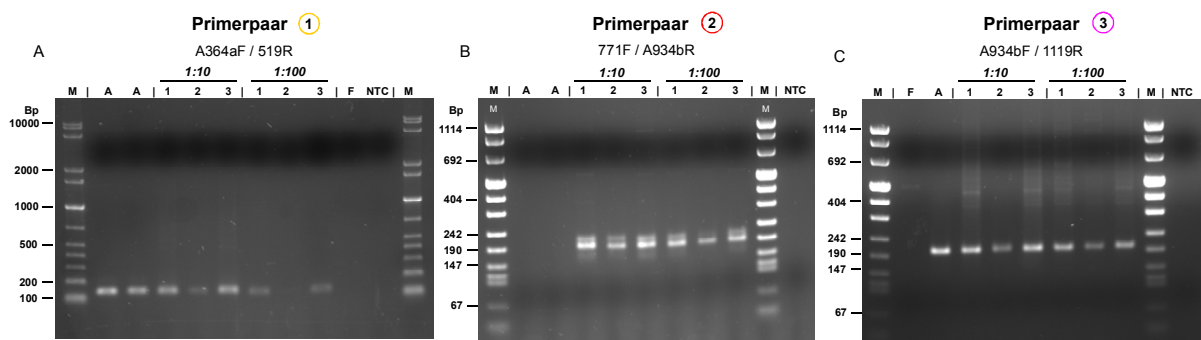


Abb. 20 PCR-Produkte der *Archaea*-Primerpaare 1 bis 3 nach 30 PCR-Zyklen. M=Größenmarker. Als *Template* wurden DNA aus nicht-fraktioniertem Boden (1) und den Fraktionen > 63 µm (2) bzw. < 2 µm (3) der Variante NPK, sowie PCR-Produkte der DNA von *Methanobacterium oryzae* (A) und *Fusarium culmorum* (F) verwendet. NTC=Kontrolle ohne *Template*-Zugabe.

Die PCR-Produkte der Primerpaare 1 und 3 waren auf dem Agarosegel deutlich zu erkennen und ihre Fragmentlängen entsprachen den Erwartungen (Abb. 20 A, C). Die mit dem zweiten Primerpaar erzeugten Produkte wiesen auf dem Agarosegel dagegen neben einer dominanten Bande in der erwarteten Größe weitere weniger intensiv gefärbte Banden auf, was auf die Bildung von Nebenprodukten hinwies. Außerdem erfolgte hier unerwartet keine Amplifikation des *Archaea*-Standards (Abb. 20 B). Auf das zweite Primerpaar wurde für die weiteren Untersuchungen deshalb verzichtet. Die beiden anderen Primerpaare wurden in qPCR-Testläufen mit den Plasmid-Standards (vgl. 2.5.5.1) und Boden-DNA eingesetzt, um die Anwendbarkeit der Methode für Bodenanalysen weiter zu prüfen.

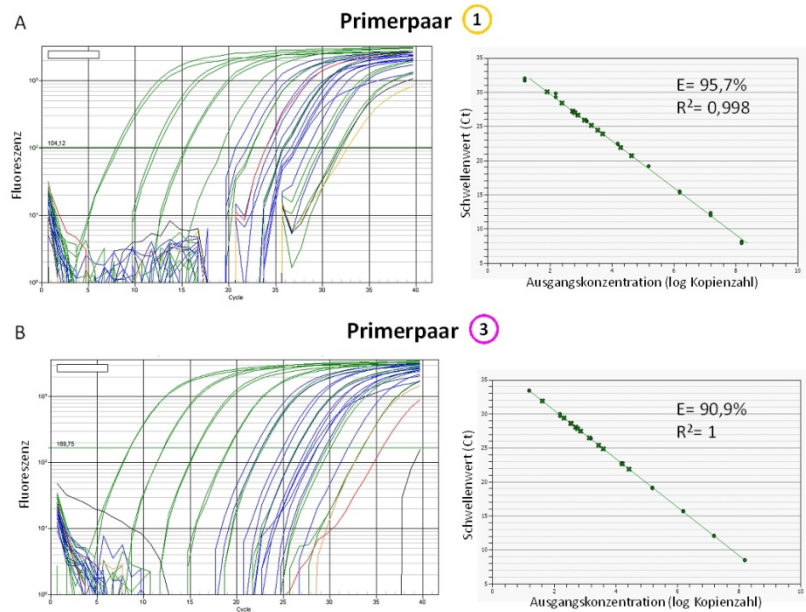


Abb. 21 Reaktionskinetik und Standardkurven der qPCR-Testläufe mit den *Archaea*-Primerpaaren 1 und 3.

Die Kinetik der Produktbildung zeigte, dass beide Primerpaare für qPCR-Analysen gut geeignet waren. Die Effizienz, die sich aus der Steigung der Standardgeraden berechnet (vgl. 2.5.5), lag über 90 % bei der DNA-Amplifikation und die Standard-Verdünnungsreihen wiesen einen idealen linearen Verlauf mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,99 bis 1 auf (Abb. 21). Die Amplifikationskurven und -raten der Boden-DNA-Extrakte waren im Vergleich zu den Positiv-Kontrollen gleich, was darauf hinwies, dass keine Hemmungen durch unspezifische DNA oder koextrahierte Bodensubstanzen (Huminstoffe etc.) auftraten. Dies wurde durch die Betrachtung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel bestätigt (Abb. 22).

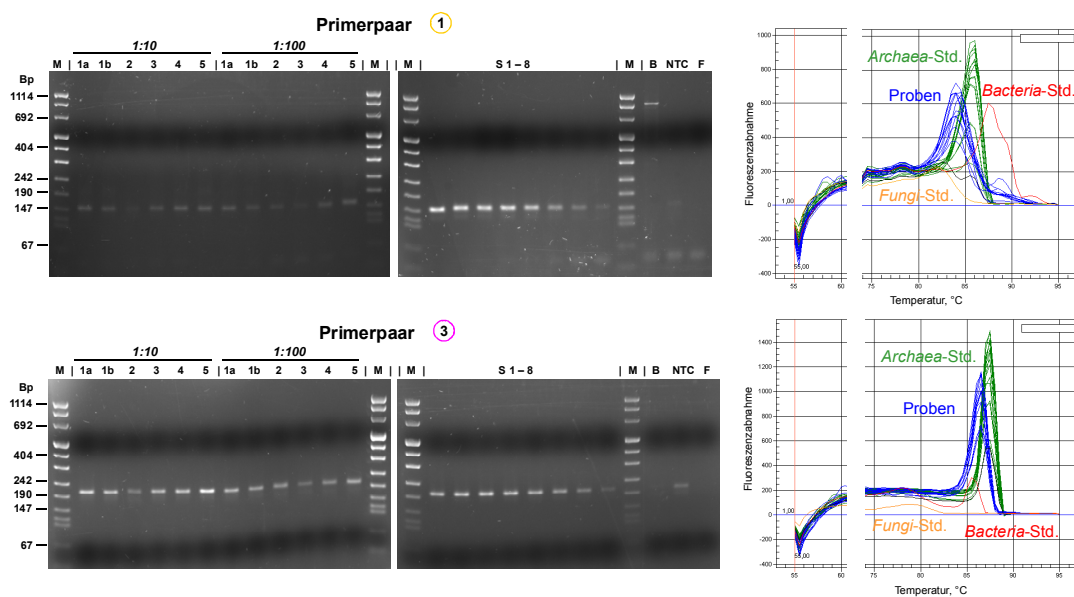


Abb. 22 PCR-Produkte und Schmelzkurvenanalyse der qPCR Testläufe mit den *Archaea*-Primerpaaren 1 und 3. M=Größenmarker, S 1-8= Verdünnungsreihe des *Archaea* Plasmid-Standards (10^1 bis 10^8 Kopien μl^{-1}). Als *Template* wurden DNA aus nicht-fraktioniertem Boden (1) und den Fraktionen $> 63 \mu\text{m}$ (2), $20-63 \mu\text{m}$ (3), $2-20 \mu\text{m}$ (4) bzw. $< 2 \mu\text{m}$ (5) der Variante NPK, sowie PCR-Produkte der DNA von *Bacillus subtilis* (B) und *Fusarium culmorum* (F) verwendet, NTC=Kontrolle ohne *Template*-Zugabe.

Die gebildete Produktmenge war bei beiden Primerpaaren 1 und 3 vergleichbar gut. Auffällig war jedoch, dass mit dem Primerpaar 1 auch DNA des *Bacteria*-PCR-Fragments amplifiziert wurde. Dabei entstand ein Produkt von ca. 1.000 bp Länge, das eine höhere Schmelztemperatur im Vergleich zu den anderen Produkten aufwies (Abb. 22, rechte Hälfte). Eine Überprüfung des Primersystems in ARB ergab, dass es sich hierbei tatsächlich um ein zusätzliches Produkt handelt, das bei Verwendung dieser Primer bei mehreren Fehlpaarungen entstehen kann. Im Gegensatz dazu traten bei Verwendung des Primerpaares 3 keine unspezifischen Banden auf. Auch die Schmelzkurvenanalyse zeigte keine Nebenprodukte (Abb. 22).

Im Gegensatz zu den *Archaea*, konnte für die Quantifizierung von *Bacteria* und *Fungi* aus Boden-DNA auf Primer aus der Literatur zurückgegriffen werden (Tab. 39).

Tab. 39 *Bacteria*- und *Fungi*-Primersysteme für den Nachweis dieser Gruppen aus Boden-DNA mit der qPCR.

Primer	Ziel	<i>E. coli</i> -Position	Sequenz (5' - 3')	Referenz	Primerkombination
Eub338	<i>Bacteria</i>	338-357	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	Lane 1991	Fierer <i>et al.</i> 2005
Eub518	<i>Bacteria</i>	518-534	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Muyzer <i>et al.</i> 1993	
NSI1	<i>Fungi</i> (<i>Dikarya</i>)	-	GAT TGA ATG GCT TAG TGA GG	Martin & Rygiewicz 2005	Martin & Rygiewicz 2005
58A2R	<i>Fungi</i> (<i>Dikarya</i>)	-	CTG CGT TCT TCA TCG AT	Martin & Rygiewicz 2005	

Eine Überprüfung des Primerpaares für *Bacteria* mit den Sequenzen aus der RDP-Datenbank ergab eine potenzielle Amplifikation von 78 % der hinterlegten Sequenzen (bei einer Fehlpaarung). Da die RDP-Datenbank keine Sequenzen für *Fungi* enthält, wurden diese ausschließlich in einer ARB-Datenbank (Version Januar 2005) überprüft. Bei einer einzelnen angenommenen Fehlpaarung wurden mit dem Vorwärtsprimer NSI1 74 % der *Fungi* erfasst. Der Rückwärtsprimer konnte dagegen nicht überprüft werden, da in der Datenbank in den meisten Fällen nur der 18S rRNA-Abschnitt der Pilz-Sequenzen vorlag, die der ITS-Fragmente bzw. der 5,8S rRNA jedoch fehlten. Die Amplifikation bei qPCR-Testläufen entsprach mit beiden Primerpaaren den Erwartungen. So ergab sich für *Bacteria* eine optimale Effizienz (100 %), während diese für *Fungi* bei 85 % lag (nicht gezeigt). Dieser Unterschied war durch die Fragmentgröße der PCR-Produkte zu erklären, die bei den *Bacteria* etwa 200 bp lang waren, bei den *Fungi* dagegen 300 bis 500 bp. Die Größe der Endprodukte konnte auf Agarosegelen bestätigt werden (keine Abbildung).

Zur Überprüfung der Primer-Spezifität für die *Archaea* und *Fungi* wurden qPCR-Fragmente aus den Testläufen mit Boden-DNA aus den Bodenvarianten nach Klonierung in *E. coli* JM109 sequenziert (2.5.11) und mit Sequenzen der NCBI-Datenbank verglichen.

Für *Archaea* wurden insgesamt 18 unterschiedliche Sequenzen erhalten (Tab. 40). 89 % dieser Sequenzen wiesen hohe Ähnlichkeiten zu bisher nicht kultivierten *Archaea* auf, wobei die meisten zu den *Crenarchaeota* gehörten. Zwei klonierte Sequenzen zeigten allerdings die höchsten Ähnlichkeiten zu Bakterien aus der Gattung der *Planctomyces*.

Im Gegensatz zu dem Vorkommen unspezifischer Produkte bei *Archaea*, waren die klonierten PCR-Produkte aus den Amplifikationen der *Fungi* immer den Pilzen als engste Verwandte zuzuordnen (Tab. 41). Dies unterstrich ihre Eignung für die qPCR zur Quantifizierung der Pilz-Populationen in Böden. Von 18 klonierten Sequenzen gehörte die Mehrzahl zu den Ascomycota, weitere zu den Basidiomycota und *Fungi incertae sedis*, was zeigte, dass das Primerpaar eine weite Spezifität für die unterschiedlichen phylogenetischen Zweige der vermutlich dominanten Pilzvertreter im Boden aufweist.

Tab. 41 Phylogenetische Zuordnung von Klonen, die mit dem Primerpaar NSI1/58A2R erzeugte PCR-Fragmente enthielten, zu Sequenzen aus der NCBI-Datenbank.

Klon	Fraktion	Länge der Partialsequenz	phylogenetische Einordnung	Nächster Verwandter in NCBI-Datenbank	Accession No.	% Ähnlichkeit
F1	> 63 µm	307	Basidiomycota	<i>Microbotryomycetes</i> sp.	FN548148*	92
F2	> 63 µm	296	Ascomycota	<i>Neonectria</i> sp.	FJ552996	93
F3	> 63 µm	308	Ascomycota	<i>Ascomycete</i> sp.	AJ302003*	83
F4	> 63 µm	305	<i>Fungi incertae sedis</i>	<i>Zygomycete</i> sp.	EF428773	100
F5	> 63 µm	303	<i>Fungi incertae sedis</i>	<i>Zygomycete</i> sp.	FJ552818	96
F6, F9	20-63 µm	336	Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp.	AB505424	96
F7	20-63 µm	305	Ascomycota	<i>Ascomycete</i> sp.	AM410602	99
F8, F14	20-63 µm, 2-20 µm	297	Ascomycota	<i>Ascomycete</i> sp.	AM901905	99
F10	2-20 µm	304 (363)	Basidiomycota	<i>Basidiomycete</i> sp.	DQ421079	99
F11	2-20 µm	302	Ascomycota	<i>Ascomycete</i> sp.	FJ554224	84
F12	2-20 µm	317	Ascomycota	<i>Sordariales</i> sp.	FJ553548*	94
F13	2-20 µm	315	Ascomycota	<i>Ascomycete</i> sp.	AJ301993*	85
F15	< 2 µm	309	Ascomycota	<i>Periconia</i> sp.	AJ246159	98
F16	< 2 µm	288 (347)	Ascomycota	<i>Ascomycete</i> sp.	GQ225117	100
F17	< 2 µm	308	Ascomycota	<i>Ascomycete</i> sp.	EU315012	84
F18	< 2 µm	305	Basidiomycota	<i>Basidiomycete</i> sp.	AM901917	100

*= mehr als 1 Übereinstimmung in der NCBI-Datenbank, ein repräsentatives Beispiel angegeben

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass die ausgewählten Primerpaare für *Bacteria*, *Archaea* (Primerpaar 3) und *Fungi* für quantitative Untersuchungen von Boden-DNA mit der qPCR geeignet waren und für weitere Analysen verwendet werden konnten.

3.3.1.2 Bestimmung der Mikroorganismen-Abundanz durch rRNA-Genkopienzahlen

Ziel dieser Analysen war es, die Abundanz der Bakterien, Archaeen und Pilze in den Bodenvarianten NIL, NPK und FYM sowie in ihren Korngrößenfraktionen zu ermitteln. Dazu wurden die Boden DNA-Extrakte mit qPCR unter Einsatz der zuvor beschriebenen Primerpaare analysiert.

Kopienzahlen im nicht-fraktionierten Boden

Die Bakterien waren die zahlenmäßig größte Mikroorganismengruppe in den Böden. Ihre Abundanz lag im Bereich von 10^{10} rRNA-Genkopien g^{-1} Boden (Trockengewicht). Die rRNA-Genkopienzahlen der Archaeen lagen im Bereich von 10^8 bis 10^9 und die der Pilze bei 10^8 rRNA-Genkopien g^{-1} Boden. Für alle drei Gruppen (*Bacteria*, *Archaea*, *Fungi*) wurden die höchsten Abundanzen in der FYM-Variante, also der mit dem höchsten C_{org} -Gehalt,

aufgefunden. Bei der ungedüngten Variante (NIL) mit dem niedrigsten C_{org} -Gehalt waren die Kopienzahlen entsprechend am niedrigsten (Abb. 24). Eine Korrelation zwischen dem C_{org} -Gehalt und den Kopienzahlen der drei Gruppen war in allen drei Bodenvarianten zu erkennen, allerdings war nur der Unterschied zwischen NIL/NPK und FYM (*Bacteria*, *Archaea*) bzw. zwischen NIL und NPK/FYM (*Fungi*) signifikant.

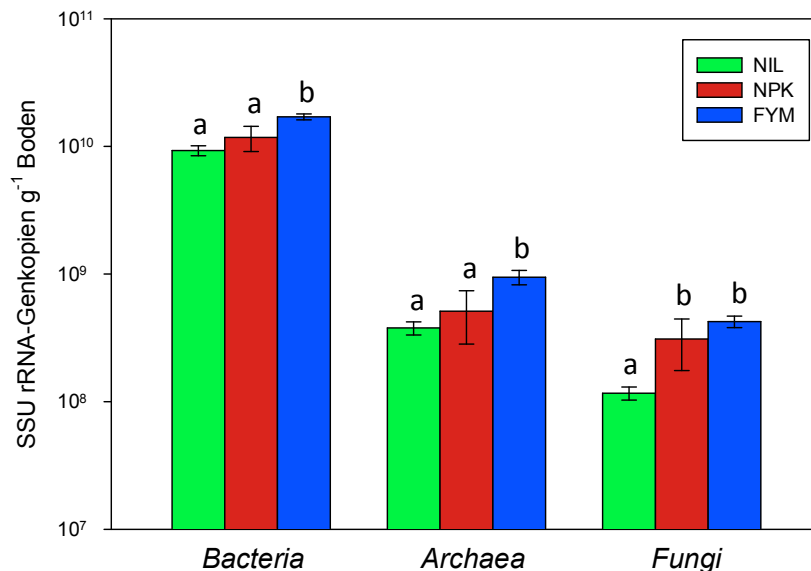


Abb. 24 *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi* SSU rRNA-Genkopienzahlen in den nicht-fraktionierten Böden der Varianten NIL, NPK und FYM (n=3). Kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer untersuchten Gruppe.

Kopienzahlen in den Korngrößenfraktionen

Die Kopienzahlen in den drei gröberen Fraktionen ($> 63 \mu\text{m}$, $20-63 \mu\text{m}$, $2-20 \mu\text{m}$) zeigten bei den drei Gruppen *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi* einen ähnlichen Trend wie beim nicht-fraktionierten Boden. Für die Bodenvarianten fanden sich die meisten SSU rRNA-Genkopien in den FYM Bodenproben. Die niedrigsten Kopienzahlen wiesen die NIL-Varianten auf (Abb. 25). Die einzige Ausnahme bildete die $2-20 \mu\text{m}$ Fraktion bei den *Archaea*, die in der NPK-Variante eine tendenziell, jedoch nicht signifikant, niedrigere Kopienzahl als die NIL-Variante aufwies. Die Kopienzahlen in der $< 2 \mu\text{m}$ -Fraktion (Ton) unterschieden sich dagegen trotz der zuvor bestimmten unterschiedlichen C_{org} -Gehalte der Bodenvarianten (siehe 3.1) nicht voneinander. Die absoluten Kopienzahlen g^{-1} Fraktion waren bei den *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi* unabhängig von der Bodenvariante in der Tonfraktion am höchsten (Abb. 25 A, B, C). Für *Fungi* fanden sich allerdings gleiche SSU rRNA-Genkopien g^{-1} in der Sandfraktion ($> 63 \mu\text{m}$) der NPK und FYM-Variante (Abb. 25 C).

Da sich die Mikroorganismen nicht in den Partikeln sondern auf deren Oberflächen befinden, wurde ein Versuch unternommen, die Abundanz der SSU rRNA-Gene auf die berechneten Oberflächen der Fraktionen (nach Köhler 2010) zu beziehen (vgl. 2.5.5.2). Dabei zeigte sich, dass die Kopienzahlen pro m^2 Oberfläche bei allen drei Gruppen in der Sandfraktion am höchsten waren (Abb. 25 D, E, F). Die SSU rRNA Genkopienzahlen m^{-2} der

drei feineren Fraktionen (20-63 μm , 2-20 μm , < 2 μm) unterschieden sich in geringerem Maße voneinander, als die Kopienzahlen g^{-1} Fraktion. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei der zur Oberflächenbestimmung angewandten EGME-Methode (Carter *et al.* 1965, Tiller & Smith 1990) auch die *innere* Oberfläche, das heißt die Schichten zwischen Mineralpartikeln gemessen wurde, in die die Mikroorganismen aufgrund ihrer Größe nicht gelangen können. Daher ist anzunehmen, dass die tatsächliche Besiedlungsdichte auf den mikrobiell zugänglichen Partikel-Oberflächen höher ausfallen dürfte, als es die Werte widerspiegeln. Dies betrifft vor allem die feineren Fraktionen, da in diesen ein größerer Anteil an mehrschichtigen aufweitbaren Tonmineralen enthalten ist.

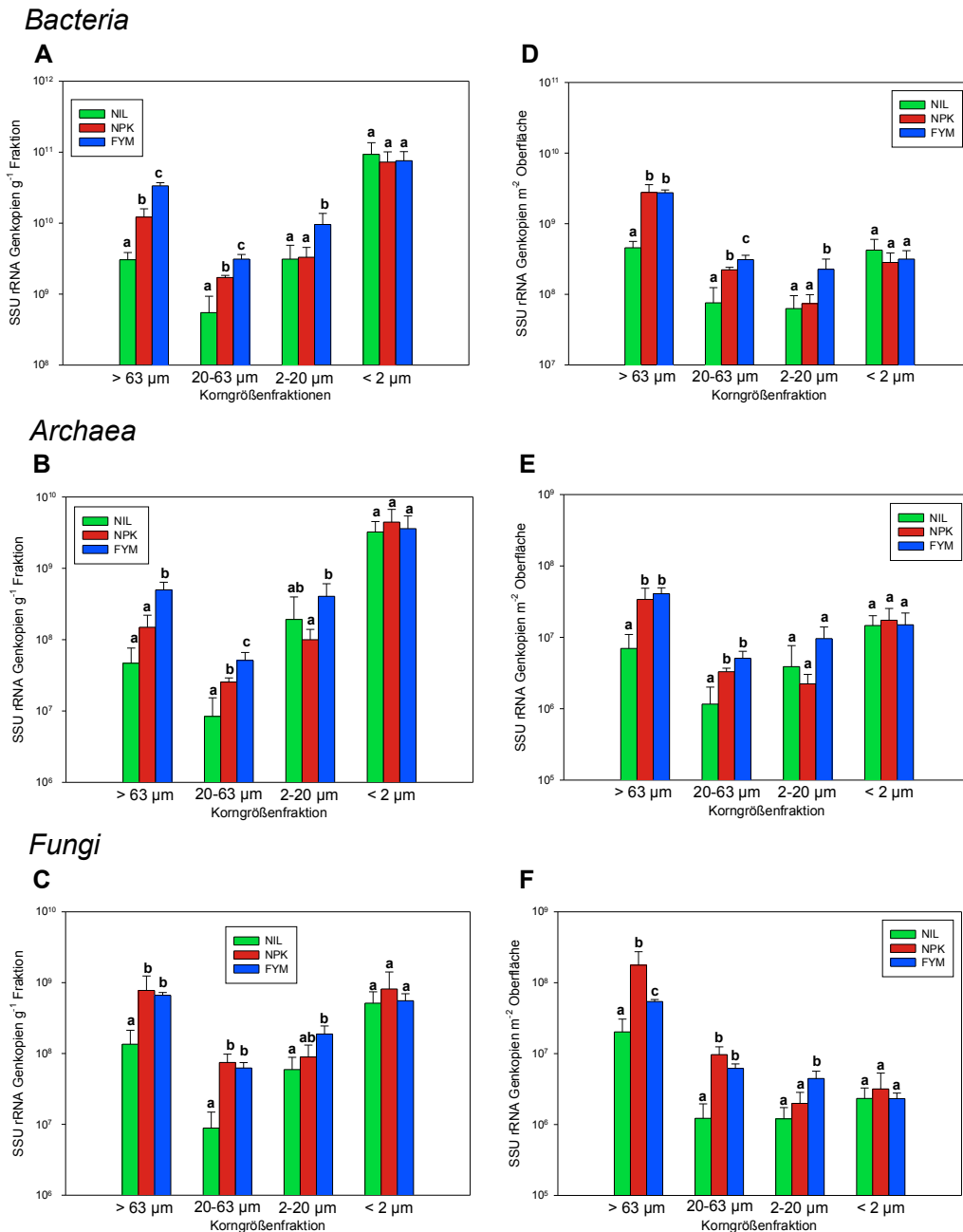


Abb. 25 *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi* SSU rRNA-Genkopienzahlen in den Korngrößenfraktionen ($n=3$) bezogen auf das Fraktionsgewicht (A bis C) und die Oberfläche (D bis F). Kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb einer Fraktion. Die zur Berechnung verwendeten Werte der Partikel-Oberflächen (Tab. 50) wurden von Anke Köhler ermittelt (Köhler 2010).

3.3.2 Charakterisierung der mikrobiellen Vielfalt durch T-RFLP

Ziel dieser Analysen war es, die Vielfalt der dominanten Bakterien in den verschiedenen Bodenvarianten und deren Korngrößenfraktionen zu vergleichen. Dazu wurden genetische Profile („Fingerprints“) mit der T-RFLP Technik (vgl. 2.5.6) auf Grundlage von PCR-amplifizierten SSU-rRNA Genabschnitten für die Gruppen *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi* aus den Boden DNA-Extrakten hergestellt. Für die *Bacteria* und *Fungi* wurde jedes PCR-Produkt parallel mit drei unterschiedlichen Enzymen (*HhaI*, *HaeIII*, *MspI*) untersucht und die Ergebnisse wurden zu einem Gesamtprofil zusammengefasst. Bei den *Archaea*-Proben wurden die T-RFLP-Profile mit nur einem Enzym (*BstUI*) erstellt. Die Ähnlichkeit der T-RFLP-Profile aus den verschiedenen Proben wurde auf Grundlage der Pearson-Korrelation berechnet und über UPGMA grafisch dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden mit einem Permutationstest ermittelt (vgl. 2.6).

T-RFLP-Profile der nicht-fraktionierten Bodenvarianten

Für jede Bodenvariante wurden vier unabhängige Wiederholungen aus verschiedenen räumlichen Bereichen (Quadrate A, B, C und D; vgl. 2.2.1) der jeweiligen Felder untersucht.

Bacteria

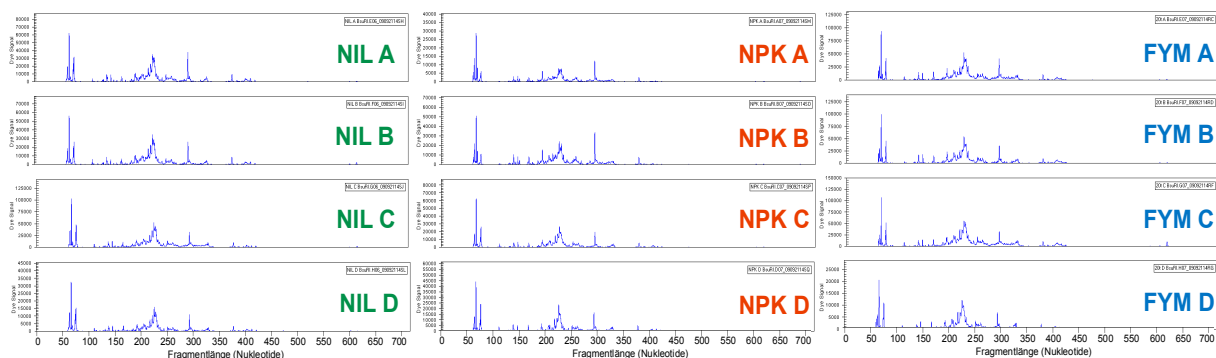


Abb. 26 *Bacteria* T-RFLP-Profile der nicht-fraktionierten Bodenvarianten (Restriktionsverdau mit *HaeIII*).

Die T-RFLP-Profile für *Bacteria* bestanden aus ca. 25 bis 35 Einzelpeaks (Abb. 26) und wiesen eine Ähnlichkeit von über 75 % zueinander auf. Dabei waren mehrheitlich Proben aus den gleichen Bodenvarianten zueinander ähnlicher als zu anderen Varianten. Eine eindeutige Clusterbildung der Bodenvarianten trat jedoch nicht auf (Abb. 27). So bildeten drei der vier FYM-Profile zwar ein gemeinsames Cluster, das vierte FYM Profil ähnelte jedoch mehr einem NPK-Profil. Die benachbarten NIL-Varianten A und B waren wiederum zueinander sehr ähnlich, jedoch zeigten sich zu den NIL-Varianten C und D Unterschiede, die im Bereich der Unterschiede zwischen verschiedenen Varianten lagen. Ähnliches galt auch für die Profile der NPK-Varianten A und B. Diese ähnelten sich ebenfalls stark, unterschieden sich aber eindeutig von den Profilen der NPK-Varianten C und D.

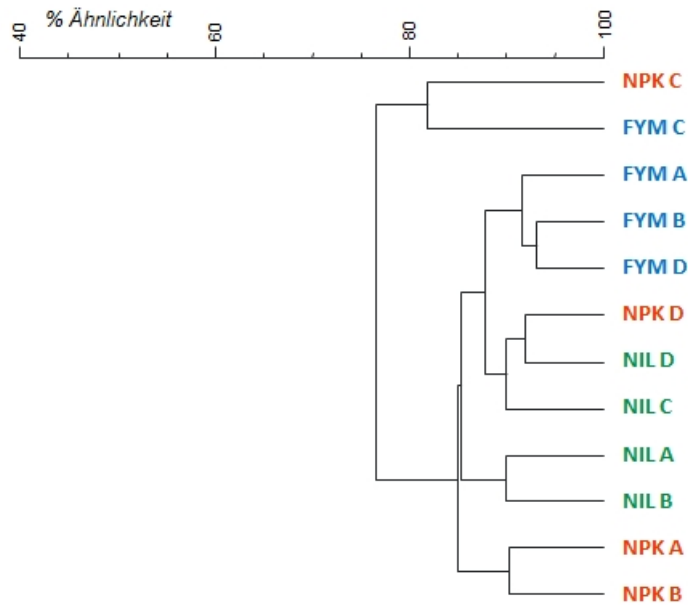


Abb. 27 UPGMA Analyse der Ähnlichkeiten der *Bacteria* T-RFLP-Profile der nicht-fraktionierten Bodenvarianten NIL, NPK und FYM. Ähnlichkeiten wurden über Pearson-Korrelation ermittelt. Die Clusteranalyse wurde mit den mit *HhaI*, *HaeIII* und *MspI* erstellten Profilen durchgeführt und der Mittelwert dargestellt.

Archaea

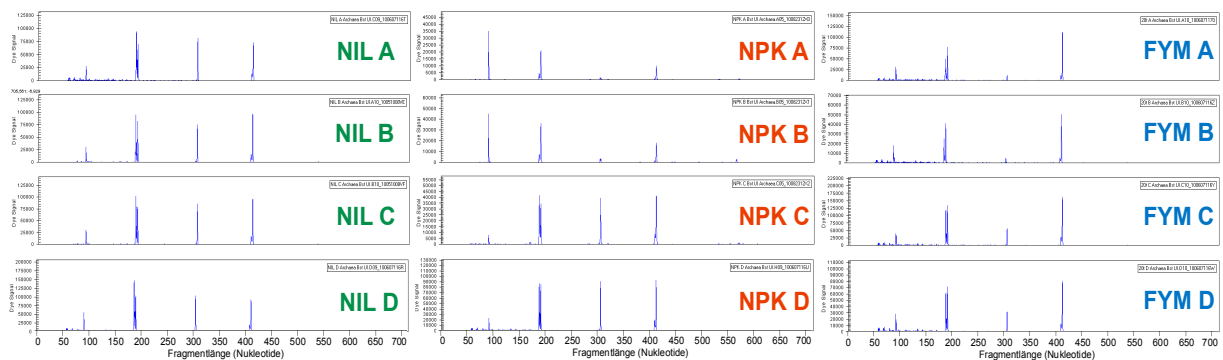


Abb. 28 Archaea T-RFLP-Profile der nicht-fraktionierten Bodenvarianten (Restriktionsverdau mit *Bst*UI).

Die *Archaea*-Profile wiesen mit 6 bis 12 Einzelpeaks deutlich weniger Vielfalt auf als die Profile der *Bacteria*. Insgesamt 5 Peaks kamen dabei in allen Proben vor (Abb. 28). Die Ähnlichkeiten zwischen den unabhängigen Profilen lagen im Bereich von 80 bis 89 % und waren damit deutlich höher als bei den *Bacteria* (Abb. 29). Im Gegensatz zu den *Bacteria* war bei den T-RFLP Profilen der *Archaea* jedoch eine klare Gruppierung in Abhängigkeit von der jeweiligen Bodenvariante erkennbar: Die FYM-Profile wurden alle einem gemeinsamen Cluster zugeordnet, das getrennt zu einem Cluster mit allen NIL/NPK-Proben auftrat. Zwei der NPK-Profile unterschieden sich von den übrigen Proben mit denen sie nur 45 % Ähnlichkeit besaßen (Abb. 29). Diese Unterschiede waren durch die erhöhte Präsenz von Fragmenten mit einer Länge von 91 bp und die geringere Anzahl an Fragmenten mit 305 bp im Vergleich zu den anderen Profilen zurückzuführen (Abb. 28). Bei der NPK-Variante

bestand, wie schon bei den *Bacteria* ermittelt, ein großer Unterschied zwischen den A, B und den C, D Parallelen, was die Hinweise auf räumliche Heterogenität auf diesem Versuchsfeld bestätigte.

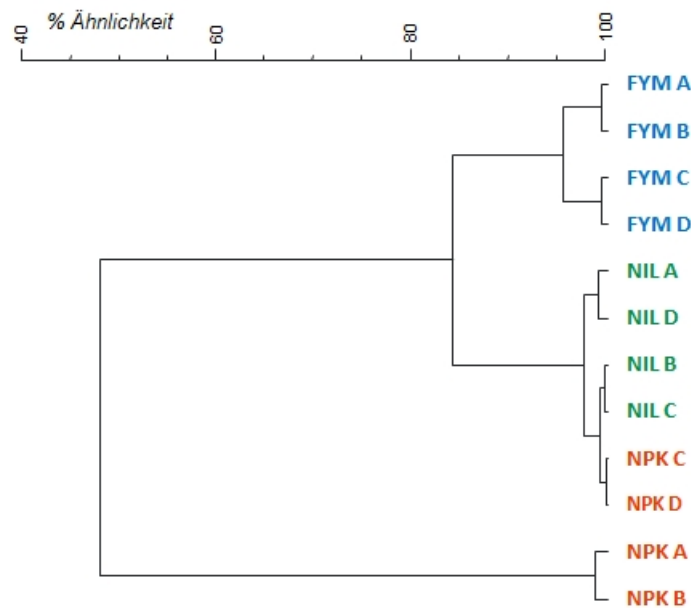


Abb. 29 UPGMA Analyse der Ähnlichkeiten der *Archaea* T-RFLP-Profile (Restriktionsverdau mit *Bst*UI) der nicht-fractionierten Bodenvarianten NIL, NPK und FYM. Ähnlichkeiten wurden über Pearson-Korrelation ermittelt.

Fungi

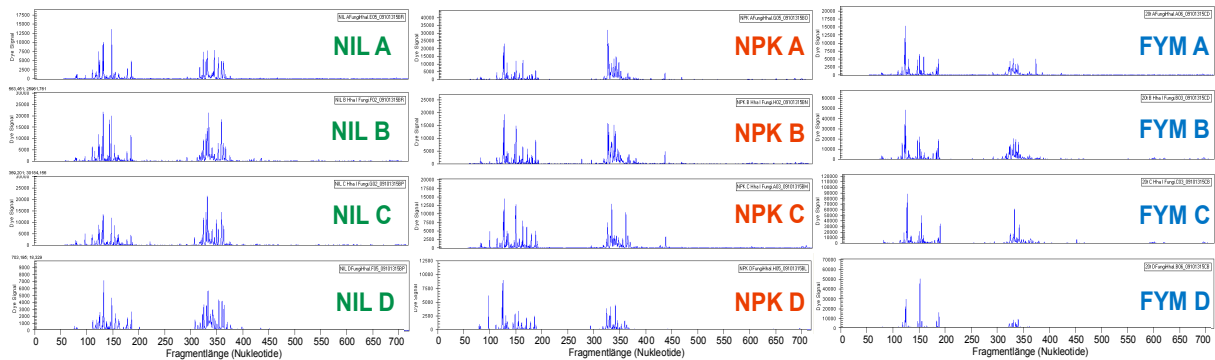


Abb. 30 *Fungi* T-RFLP-Profile der nicht-fractionierten Bodenvarianten (Restriktionsverdau mit *Hha*I).

Die T-RFLP Profile der *Fungi* bestanden aus 10 bis 30 Einzelpeaks, wobei insgesamt weniger Fragmente in den Profilen der FYM-Bodenvariante erkennbar bzw. dominant waren (Abb. 30). Diese Unterschiede der FYM-Varianten zu den übrigen konnten durch die Clusteranalyse bestätigt werden. Es zeigte sich jedoch auch, dass sich die NPK und NIL-Varianten deutlich unterschieden, so dass hier ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Bodenvarianten und der Vielfalt der Bodenpilze nachgewiesen wurde. Innerhalb jeder Bodenvariante betrugen die Ähnlichkeiten 75 bis 90 %, während es deutliche Unterschiede zu denen der anderen Bodenvarianten gab (50 bis 65 % Ähnlichkeit) (Abb. 31).

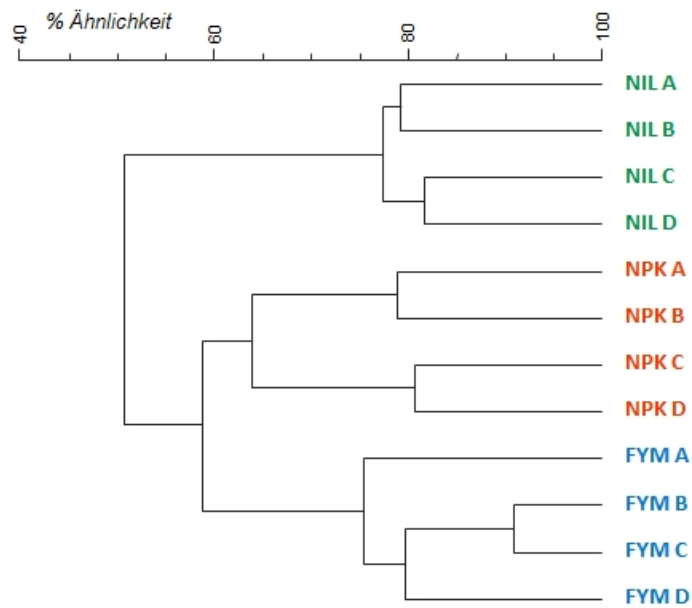


Abb. 31 UPGMA Analyse der Ähnlichkeiten der *Fungi* T-RFLP-Profile der nicht-fraktionierten Bodenvarianten NIL, NPK und FYM. Ähnlichkeiten wurden über Pearson-Korrelation ermittelt. Die Clusteranalyse wurde mit den mit *HhaI*, *HaeIII* und *MspI* erstellten Profilen durchgeführt und der Mittelwert dargestellt.

Interessant war die Tatsache, dass für alle drei Mikroorganismengruppen innerhalb der NPK-Variante immer die benachbarten Proben A und B ähnlicher waren als diese zu C und D. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Unterschiede auf Heterogenitäten im Feld zurückzuführen waren. Dafür spricht auch, dass die pH-Werte von A und B 5,8 und 5,6 betrugen, während die von C und D bei 6,3 lagen (vgl. 3.1).

T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen

Bacteria

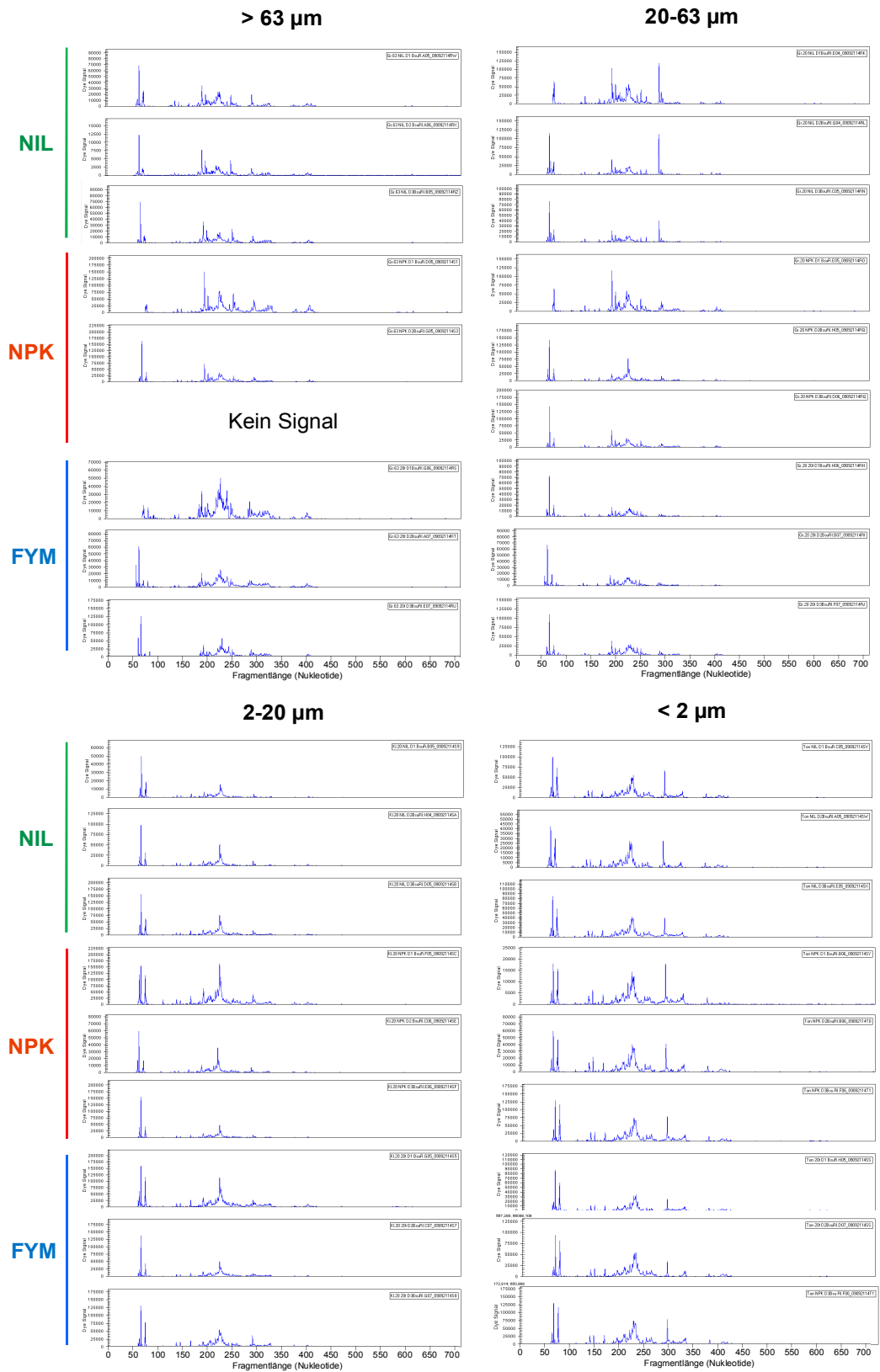


Abb. 32 Bacteria T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit *HaeIII*).

Die T-RFLP Profile für *Bacteria* aus den verschiedenen Korngrößenfraktionen unterschieden sich voneinander. Unterschiede zwischen den Fraktionen waren qualitativ, aber vor allem auch quantitativ. Beispielsweise zeigte sich bei den mit *Hae*III erstellten T-RFLP-Profilen an dem 239 bp-Fragment ein deutlich höherer Anteil in der Tonfraktion (Abb. 32).

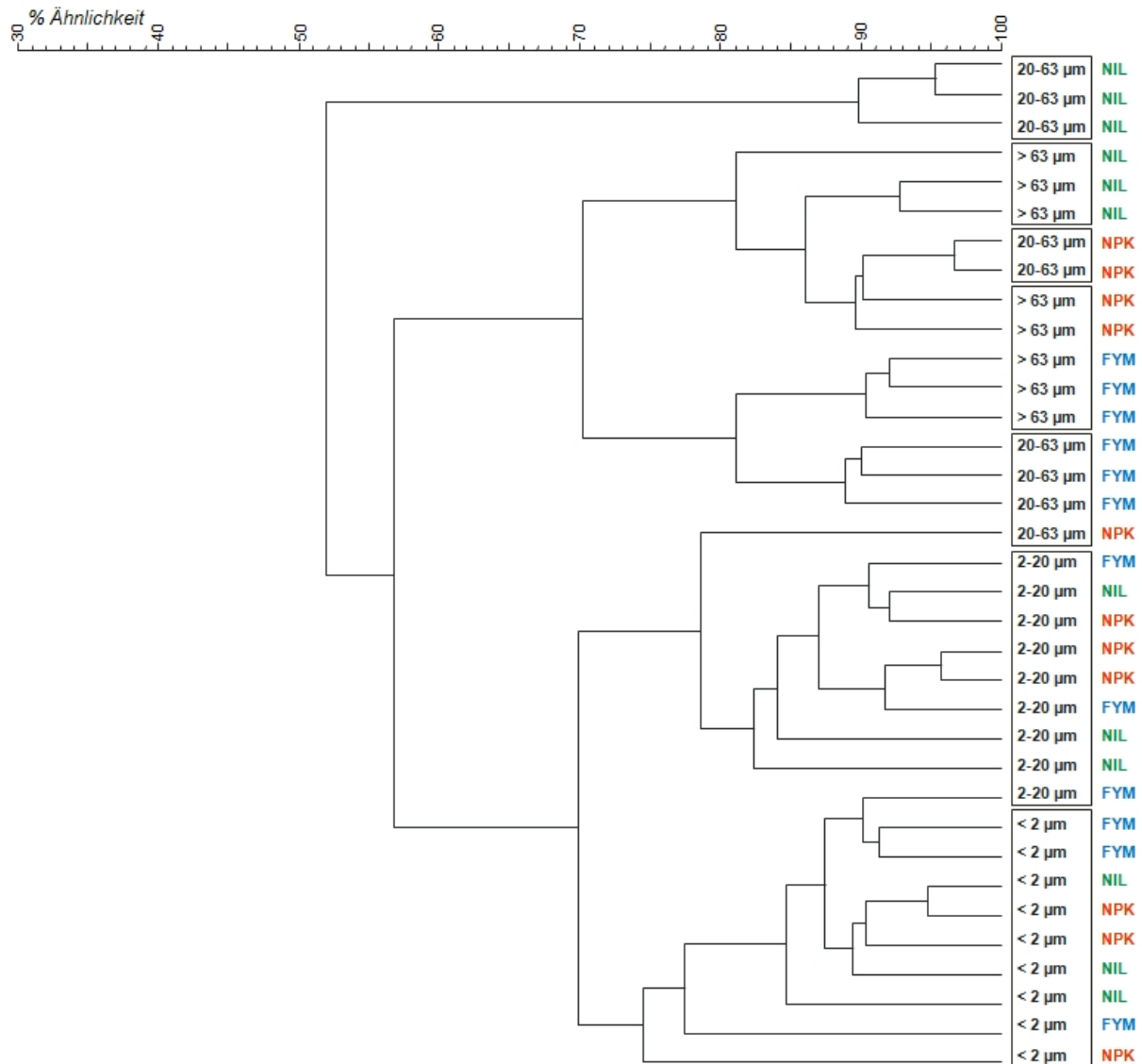
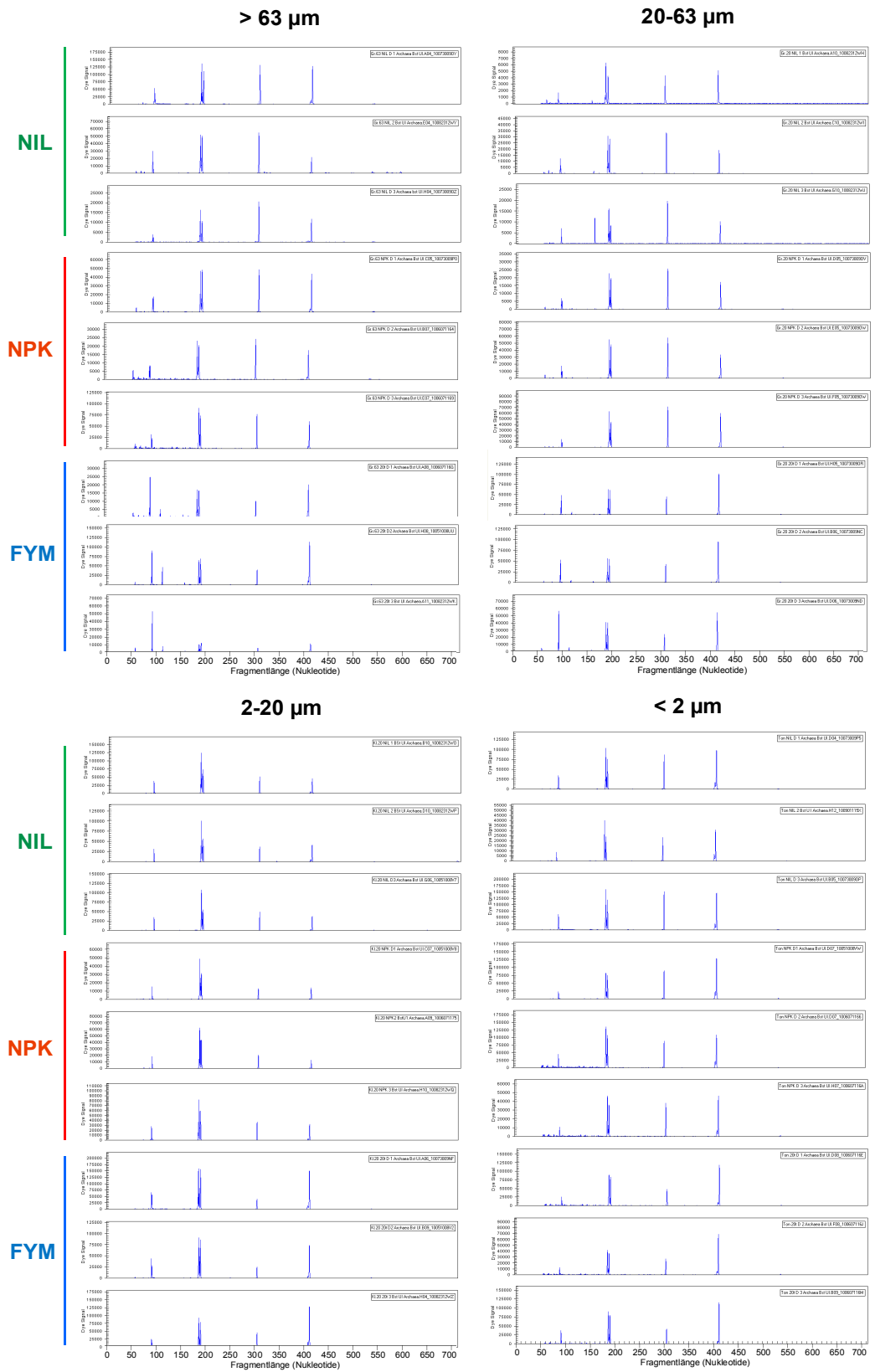


Abb. 33 UPGMA Analyse der Ähnlichkeiten der *Bacteria* T-RFLP-Profile von Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM. Ähnlichkeiten wurden über Pearson-Korrelation ermittelt. Die Clusteranalyse wurde mit den mit *Hha*I, *Hae*III und *Msp*I erstellten Profilen durchgeführt und der Mittelwert dargestellt.

Diese Unterschiede zwischen den Korngrößenfraktionen sowie der Einfluss der Bodenvarianten auf die *Bacteria*-Vielfalt konnten durch die Clusteranalyse verdeutlicht werden (Abb. 33). So teilten sich die Profile auf zwei große Cluster auf, bei denen eines die gröberen Fraktionen (> 63 µm und 20-63 µm) und das andere die feineren (2-20 µm und < 2 µm) enthielt. Die T-RFLP Profile aus der feinsten Korngrößenfraktion (< 2 µm) wiesen untereinander höhere Ähnlichkeiten auf und bildeten innerhalb dieses größeren Clusters eine von den 2-20 µm Fraktionen getrennte Gruppe. Die unterschiedlichen Bodenvarianten, und damit verbunden die verschiedenen C_{org}-Gehalte, hatten in diesen feineren

Korngrößenfraktionen keinen erkennbaren Einfluss auf die Zusammensetzung der *Bacteria*-Gemeinschaft. Bei den gröberen Fraktionen war dagegen neben der Aufteilung nach den Korngrößenfraktionen auch ein Einfluss der Bodenvariante erkennbar. Besonders deutlich war dies an den Profilen der FYM-Variante zu erkennen, die eine eigene Untergruppe innerhalb des Clusters bildeten. Die T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktion 20-63 µm der Variante NIL unterschieden sich für alle drei unabhängigen Wiederholungen von den übrigen Profilen (nur 52 % Ähnlichkeit zu den anderen Gruppen) und bildeten ein getrenntes Cluster.

Archaea**Abb. 34 Archaea T-RFLP-Profil der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit *Bst*UI).**

Die T-RFLP-Profile für die *Archaea* bestanden aus deutlich weniger Peaks und waren untereinander ähnlicher als die für die *Bacteria*, wie bereits an den nicht-fraktionierten Böden ermittelt. Eine eindeutige Korrelation zwischen *Archaea*-Vielfalt und den Korngrößen oder C_{org} -Gehalten war nicht zu erkennen. Tendenziell waren die unabhängigen Wiederholungen jedoch zueinander ähnlicher als die aus unterschiedlichen Fraktionen oder Bodenvarianten (Abb. 34). Die Korngrößenfraktionen der FYM-Variante bildeten getrennte Cluster zur entsprechenden Fraktion der beiden Bodenvarianten mit geringerem C_{org} -Gehalt aus. Auch die T-RFLP Profile der $< 20 \mu m$ -Fraktionen wiesen ein von den anderen Fraktionen getrenntes Cluster auf (Abb. 35). Demnach schienen Korngrößenfraktionen und Bodenvarianten einen gewissen Einfluss auf die strukturelle Diversität der dominanten *Archaea* auszuüben.

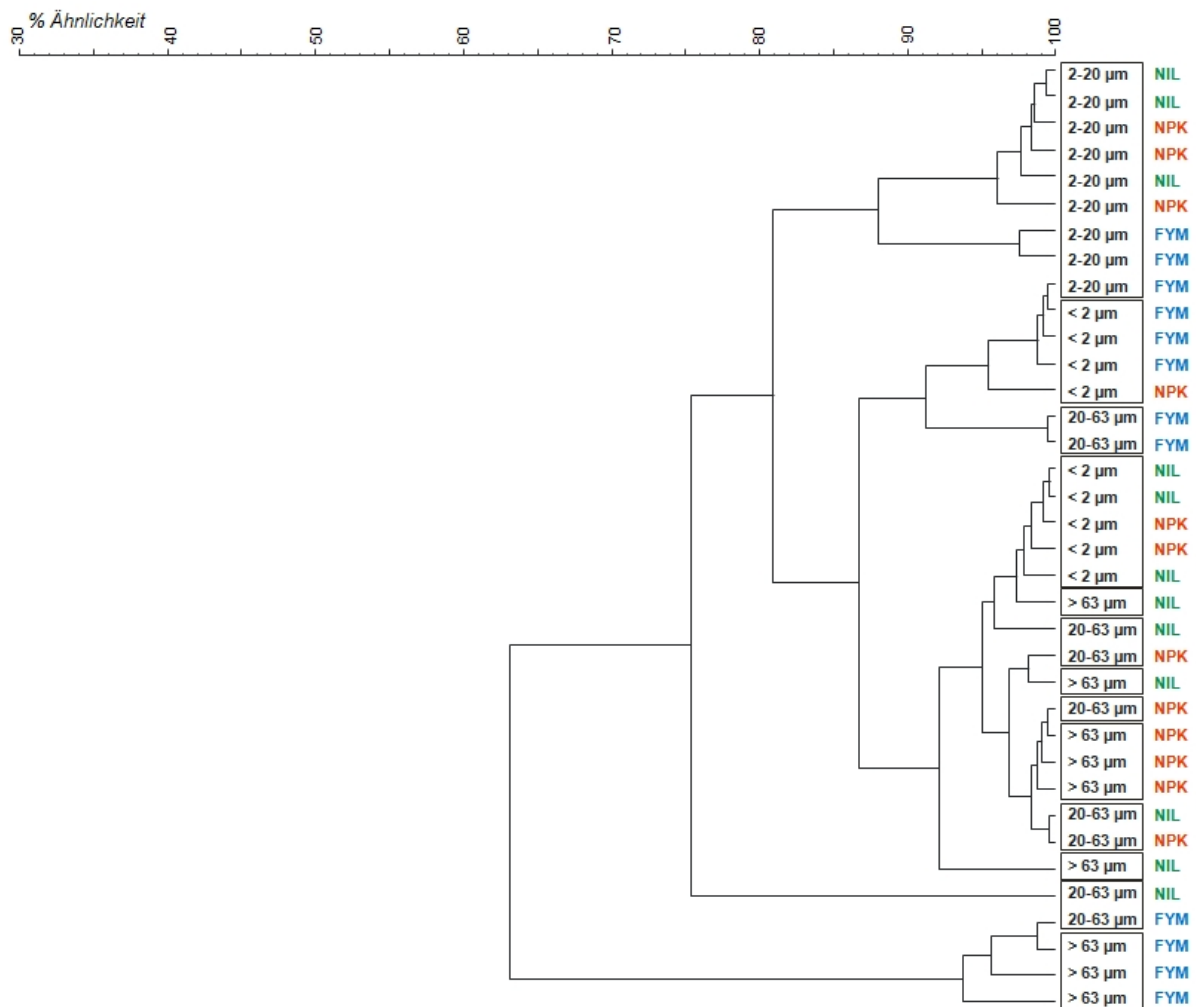


Abb. 35 UPGMA Analyse der Ähnlichkeiten der *Archaea* T-RFLP-Profile (Restriktionsverdau mit *Bst*UI) von Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM. Ähnlichkeiten wurden über Pearson-Korrelation ermittelt.

Fungi

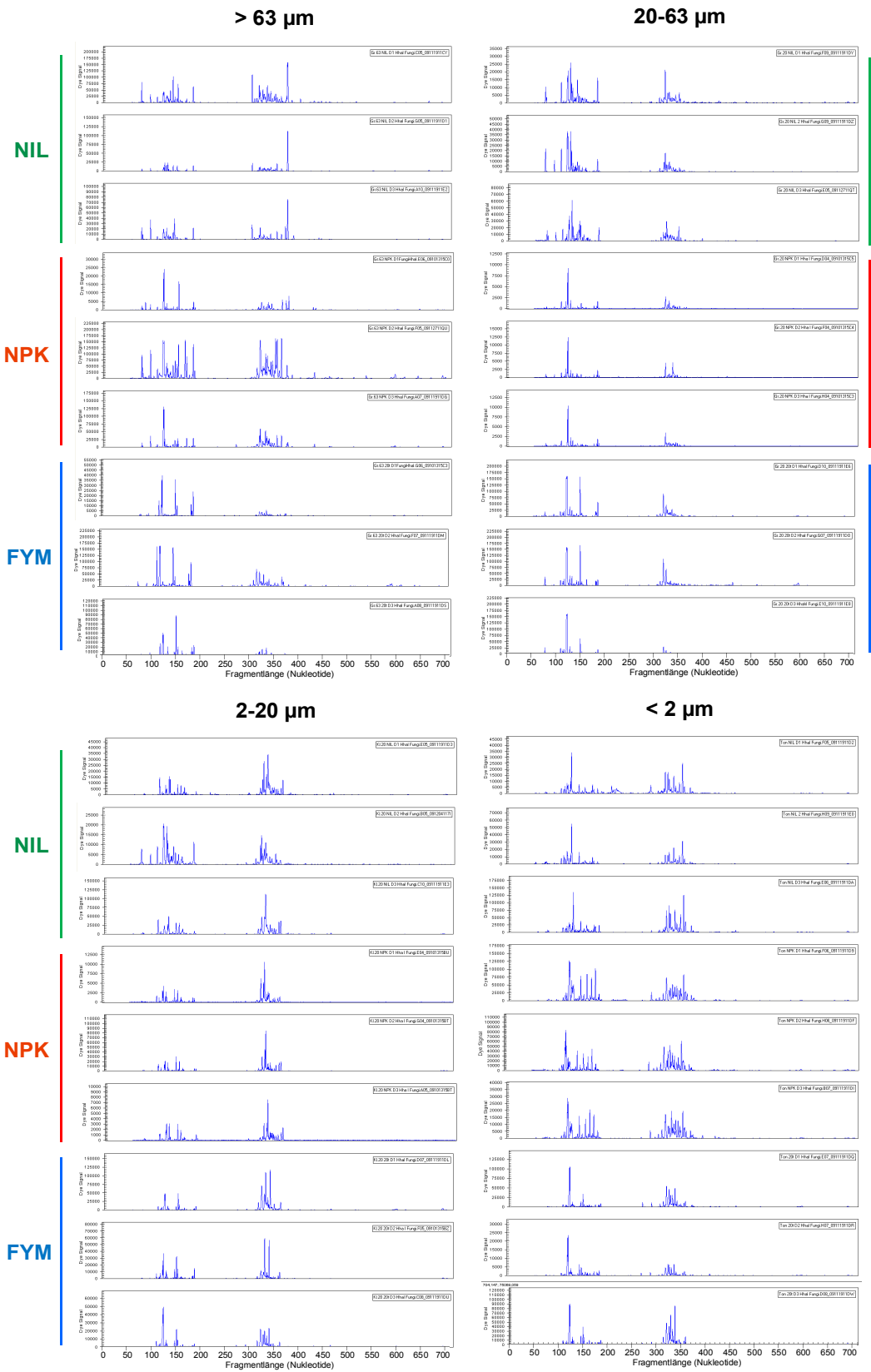


Abb. 36 Fungi T-RFLP-Profil der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit *HhaI*).

Die T-RFLP-Profile mit Spezifität für die Gruppe der *Fungi* aus den verschiedenen Korngrößenfraktionen waren denen aus den nicht-fraktionierten Böden sehr ähnlich. Die T-RFLP-Profile unterschieden sich in Abhängigkeit von der Korngröße und der Bodenvariante voneinander. Dies zeigte sich bei den mit *HhaI* erstellten Profilen z. B. anhand der Peaks der $> 63 \mu\text{m}$ -Fraktion der unterschiedlichen Bodenvarianten und ein Vergleich dieser mit denen der anderen Korngrößenfraktionen (Abb. 36). Die T-RFLP-Profile teilten sich in zwei größere Cluster auf. In einem davon befanden sich alle Profile der FYM-Variante, in einem weiteren fast alle Profile der NIL-Variante (Abb. 37). Eine Ausnahme bildeten dabei die $> 63 \mu\text{m}$ NIL Proben, die sich mit nur 32 % Ähnlichkeit sehr stark von den übrigen Proben unterschieden und ein separates Cluster formten. Die beiden gröberen Fraktionen der NPK-Variante bildeten innerhalb des FYM-Clusters eine eigene Untergruppe. Die beiden feineren NPK-Fraktionen fanden sich dagegen im NIL-Cluster wieder. Innerhalb dieser beiden Cluster gruppierten sich die Profile der gleichen Korngrößenfraktion zusammen. Dies wies darauf hin, dass der C_{org} -Gehalt einen stärkeren Einfluss auf die Zusammensetzung der dominanten Bodenpilze hatte als die jeweilige Korngrößenfraktion.

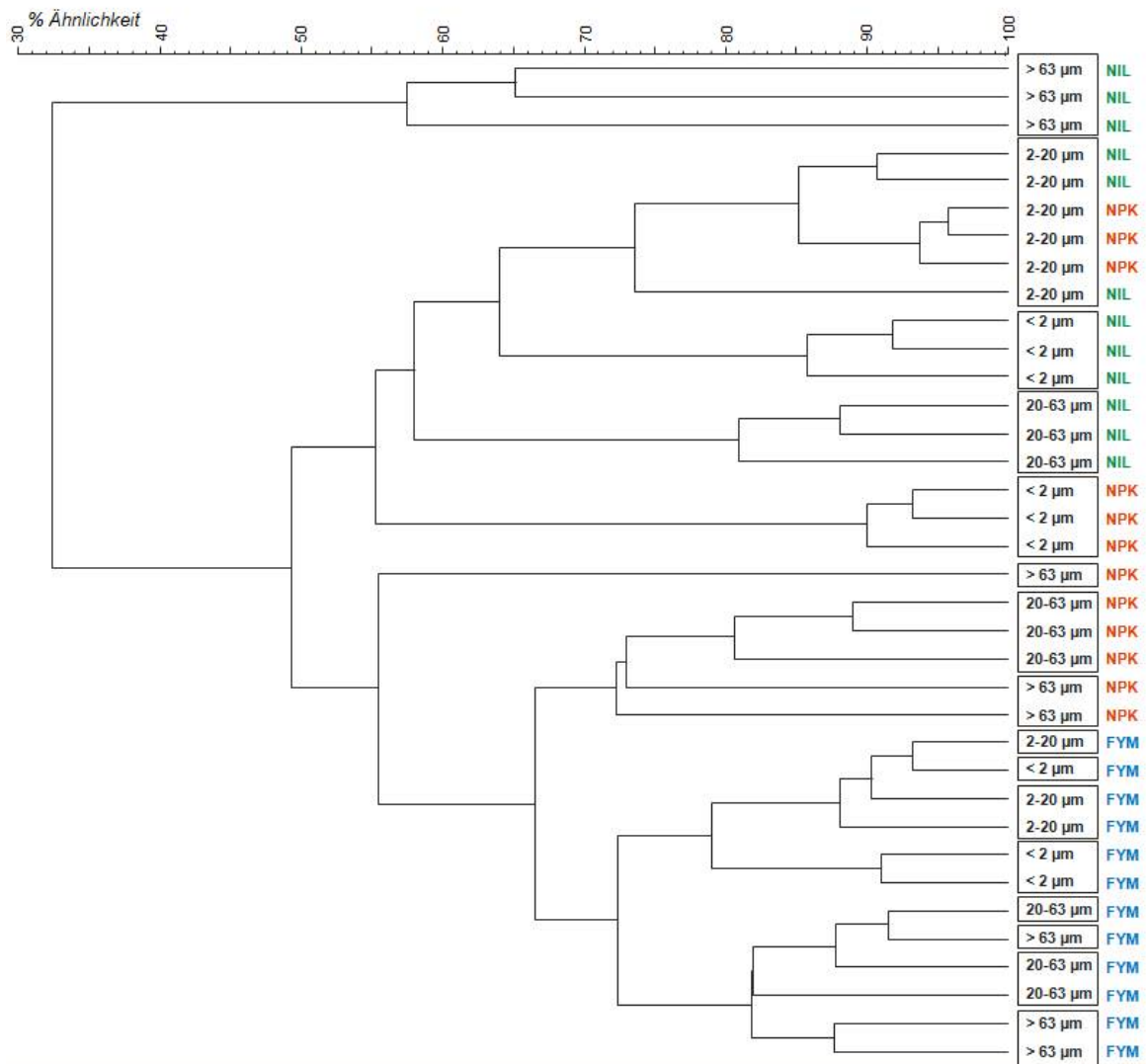


Abb. 37 UPGMA Analyse der Ähnlichkeiten der *Fungi* T-RFLP-Profile von Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM. Ähnlichkeiten wurden über Pearson-Korrelation ermittelt. Die Clusteranalyse wurde mit den mit *HhaI*, *HaeIII* und *MspI* erstellten Profilen durchgeführt und der Mittelwert dargestellt.

Insgesamt zeigen die T-RFLP Profile der Korngrößenfraktionen für alle untersuchten Gruppen, also *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi*, einen Einfluss der Bodenvarianten und damit des C_{org} -Gehalts auf die Zusammensetzung der jeweiligen dominanten Vertreter (denn nur diese sind mit der T-RFLP-Technik nachweisbar). Dieser Einfluss war bei den *Bacteria* allerdings nur in den gröberen Fraktionen erkennbar. Dass die feineren Fraktionen quantitativ deutlich mehr zu den mikrobiellen Gemeinschaften des Bodens beitragen als die gröberen (vgl. 3.2.3), erklärt auch, warum die Profile des nicht-fraktionierten Bodens (vgl. Abb. 26) keine so ausgeprägte Reaktion auf den organischen Kohlenstoff zeigten. Dagegen konnte bei den *Archaea* und auch bei den *Fungi* sowohl in den nicht-fraktionierten Böden, als auch in den Fraktionen ein deutlicher Unterschied in der strukturellen Diversität in Abhängigkeit von der Bodenvariante gezeigt werden.

3.4 Bedeutung der Bodenvarianten und Korngrößenfraktionen für die Sorption und den mikrobiellen Abbau von Phenol und 2,4-DCP

Der Abbauprozess der beiden organischen Schadstoffe Phenol und 2,4-DCP in Böden sollte unter dem Einfluss unterschiedlicher natürlicher organischer Kohlenstoffgehalte charakterisiert werden, um dabei Hinweise auf die abbauenden Mikroorganismen und deren Beeinflussung zu erhalten. Untersucht wurde hierfür die Verteilung der beiden Schadstoffe in Böden in Abhängigkeit ihrer Sorptionseigenschaften und ihrer Abbauraten in den verschiedenen Bodenvarianten. Die am Abbau beteiligten Mikroorganismen wurden mit einer kultivierungsunabhängigen Methode, dem *stable isotope probing* (SIP), nachgewiesen (vgl. 2.5.7).

3.4.1 Sorption von Phenol und 2,4-DCP an die nicht-fraktionierten Bodenvarianten und Korngrößenfraktionen

Um mögliche Einflüsse des organischen Kohlenstoffgehalts auf die Verteilung des Phenols und 2,4-DCP im Boden und ihre Anlagerung an Bodenpartikel zu betrachten, wurden ihre Sorptionseigenschaften in den nicht-fraktionierten Bodenvarianten und ihren Korngrößenfraktionen untersucht. Dafür wurde die absolute und prozentuale Sorption von fünf unterschiedlichen Konzentrationen der beiden Substanzen an den nicht-fraktionierten Boden ermittelt und daraus der Verteilungskoeffizient K_d berechnet (2.4.2). Dieser stellt ein Maß für die sorbierte Menge dar. Je höher der K_d -Wert ist, desto mehr verlagert sich das Gleichgewicht zwischen gelöster und sorbierter Substanz zum sorbierten Teil. Liegt der Wert unter $1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ist im Gleichgewichtszustand die Konzentration in der wässrigen Phase höher als im Boden. Um zu überprüfen, ob die Unterschiede zwischen den Bodenvarianten auf den C_{org} -Gehalt zurückzuführen waren, wurde aus dem K_d der K_{oc} -Wert abgeleitet. Dieser Wert normiert den K_d anhand der C_{org} -Gehalte der Böden (2.4.2). Die Verteilung von Phenol bzw. 2,4-DCP auf die Korngrößenfraktionen wurde anhand von jeweils drei der Konzentrationen aus den Sorptionsversuchen untersucht. Dafür wurden die ^{14}C -markierten Verbindungen den Böden zugesetzt und die Proben wie zuvor beschrieben fraktioniert (2.2.3), um dann die

Radioaktivität in den Korngrößen zu bestimmen (2.4.3). Ein Teil der hier dargestellten Werte wurden aus anderen parallelen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe ermittelt: Die Werte für die Phenolkonzentrationen 1 und 10 mM stammen von Denis Finke (Finke 2009), die der Sorption von 2,4-DCP wurden von Anke Köhler zur Verfügung gestellt (Köhler 2010).

Sorption an die nicht-fraktionierten Bodenvarianten

Die an den Boden sorbierte absolute Menge stieg bei beiden Substanzen (Phenol, 2,4-DCP) mit der Konzentration der zugegebenen Lösung an (Abb. 38). Der prozentuale Anteil der gebundenen Substanz korrelierte dagegen in beiden Fällen negativ mit der Konzentration (Abb. 39).

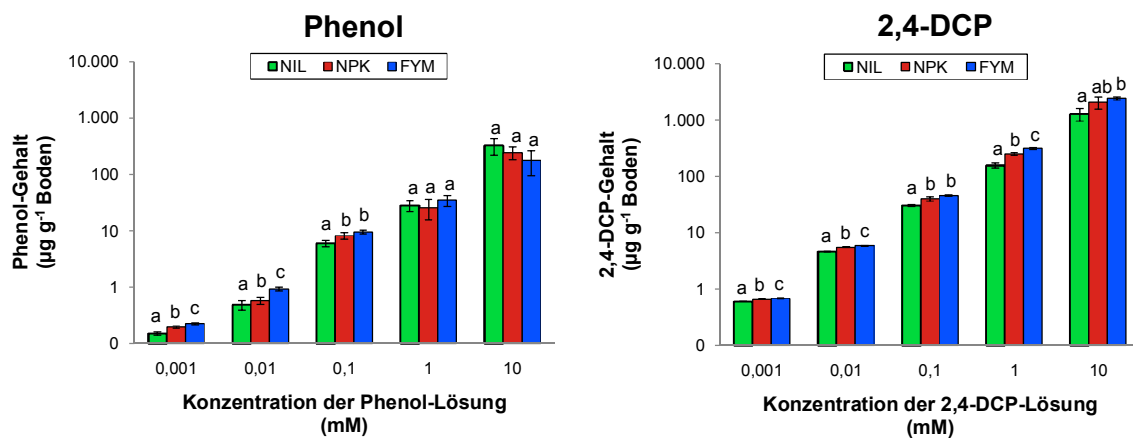


Abb. 38 An den Bodenvarianten sorbierte Phenol- und 2,4-DCP-Mengen ($n=3$) nach der Zugabe unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen der Schadstoffe. Kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb jeder Konzentrationsstufe.

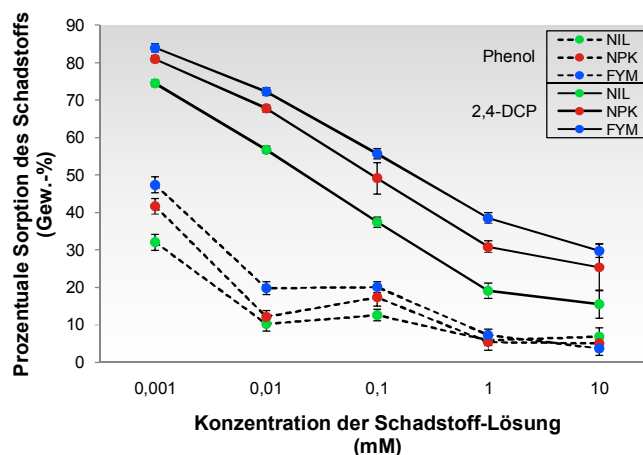


Abb. 39 Prozentuale Sorption von Phenol und 2,4-DCP an den Bodenvarianten NIL, NPK, FYM in Abhängigkeit von der Konzentration der Schadstoffe ($n=3$).

Bei der niedrigsten Phenol-Konzentration (0,001 mM) lagen 30 bis 50 % des Phenols am Boden gebunden vor, während es bei 0,01 und 0,1 mM zwischen 10 und 20 % und bei den höchsten Konzentrationen (1 und 10 mM) nur 3 bis 7 % waren. Beim 2,4-DCP waren bei der

niedrigsten Konzentration (0,001 mM) 74 bis 85 % und bei der höchsten (10 mM) 15 bis 30 % an den Boden adsorbiert. Die unterschiedlichen Bodenvarianten beeinflussten die Sorption des Phenols nur bei den drei niedrigeren Konzentrationen. Die an der FYM-Variante sorbierten Mengen waren dabei signifikant höher als bei NIL. Die Konzentrationen 1 und 10 mM wiesen dagegen keine Unterschiede zwischen den Bodenvarianten auf. Im Gegensatz dazu zeigte sich beim 2,4-DCP bei allen Konzentrationen eine positive Korrelation mit dem organischen Kohlenstoffgehalt der drei Bodenvarianten. Bei den Konzentrationen 0,001, 0,01 und 1 mM unterschieden sich alle Bodenvarianten signifikant voneinander, während bei 0,1 und 10 mM signifikante Unterschiede nur zwischen NIL und den Varianten NPK bzw. FYM erkennbar waren, nicht jedoch zwischen NPK und FYM (Abb. 38, Abb. 39). Die an Boden sorbierten Mengen waren beim 2,4-DCP immer deutlich höher als beim Phenol. Die absolut sorbierte Menge des 2,4-DCP betrug im Mittel aller Konzentrationen das 5- bis 7-fache des Phenols. Der prozentuale Anteil des an den Boden gebundenen 2,4-DCP war im Mittel um den Faktor 3 (NIL) oder 4 (NPK, FYM) höher als der des Phenols. Dies spiegelte sich auch im Verteilungskoeffizienten K_d wider, dessen Werte für das Phenol bei der gleichen Konzentration immer niedriger waren als die für das 2,4-DCP (Tab. 42). Die K_d -Werte für das Phenol lagen mit Ausnahme der niedrigsten Konzentration in einem Bereich von $1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ oder darunter. Im Gegensatz dazu wurde beim 2,4-DCP nur bei der NIL-Variante und einer Konzentration von 10 mM ein Wert unter $1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ermittelt. Dies weist darauf hin, dass das Phenol auch bei niedrigeren Konzentrationen bevorzugt in der wässrigen Phase zu finden war, das 2,4-DCP dagegen auch bei höheren Konzentrationen an Bodenbestandteilen sorbiert bleibt. Dieses Verhalten korreliert damit mit der unterschiedlichen Wasserlöslichkeit der beiden Substanzen.

Tab. 42 K_d -Werte ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$) der Sorption von Phenol und 2,4-DCP der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM. Kleine hochgestellte Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb jeder Konzentrationsstufe.

		Konzentration (mM)				
Bodenvariante		0,001	0,01	0,1	1*	10*
Phenol	NIL	2,36 ^a	0,57 ^a	0,72 ^a	0,32 ^a	0,37 ^a
	NPK	3,38 ^b	0,70 ^a	1,05 ^b	0,29 ^a	0,27 ^a
	FYM	4,49 ^c	1,24 ^b	1,26 ^b	0,40 ^a	0,20 ^a
2,4-DCP*	NIL	14,58 ^d	6,50 ^c	3,00 ^c	1,18 ^b	0,92 ^b
	NPK	21,13 ^e	10,5 ^d	4,83 ^d	2,23 ^c	1,70 ^{bc}
	FYM	26,05 ^f	13,01 ^e	6,29 ^e	3,13 ^d	2,12 ^c

*= im Rahmen einer Bachelor- bzw. Diplomarbeit ermittelte Werte (Finke 2009, Köhler 2010)

Die K_{oc} -Werte der Bodenvarianten bei einer Phenol-Konzentration von 0,1 mM ähnelten sich im Vergleich zum K_d -Wert stärker und wiesen keine signifikanten Unterschiede mehr auf (Tab. 43). Die signifikanten Unterschiede zwischen den Bodenvarianten der beiden niedrigsten Konzentrationen (0,001 mM, 0,01 mM) blieben jedoch erhalten. Auch beim 2,4-DCP ähnelten sich die K_{oc} -Werte stärker als die K_d -Werte. Hier waren nach Berücksichtigung des C_{org} -Gehalts bei keiner der Konzentrationen mehr Unterschiede zwischen den gedüngten Bodenvarianten (NPK, FYM) zu erkennen. Anhand der K_{oc} -Werte konnte daher gezeigt werden, dass die Unterschiede im Sorptionsverhalten der beiden

organischen Schadstoffe zu einem beachtlichen Teil auf den C_{org} -Gehalt zurückzuführen waren.

Tab. 43 K_{oc} -Werte ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) der Sorption von Phenol und 2,4-DCP der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM. Kleine hochgestellte Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb jeder Konzentrationsstufe.

		Konzentration (mM)				
Bodenvariante		0,001	0,01	0,1	1*	10*
Phenol	NIL	132,54 ^a	32,27 ^a	40,70 ^a	17,76 ^a	20,99 ^a
	NPK	160,98 ^b	33,13 ^a	50,16 ^a	13,77 ^a	12,96 ^a
	FYM	172,61 ^c	47,50 ^b	48,30 ^a	15,30 ^a	7,52 ^a
2,4-DCP*	NIL	819,34 ^d	368,48 ^c	168,42 ^b	66,56 ^b	51,95 ^b
	NPK	1001,46 ^e	497,62 ^d	228,75 ^{bc}	105,77 ^c	80,72 ^{bc}
	FYM	1004,52 ^e	501,55 ^d	242,41 ^c	120,83 ^c	81,85 ^c

* = im Rahmen einer Bachelor- bzw. Diplomarbeit ermittelte Werte (Finke 2009, Köhler 2010)

Die ermittelten Verteilungskoeffizienten und die aus diesen abgeleiteten K_{oc} -Werte spiegeln allein das Sorptionsverhalten bei einer bestimmten Schadstoff-Konzentration wider und berücksichtigen nicht, dass mit einer zunehmenden Beladung der Bodenpartikel insgesamt weniger Sorbat aufgenommen werden kann. Daher unterschieden sich die ermittelten Werte der gleichen Bodenvariante auch in Abhängigkeit von der zugegebenen Schadstoff-Konzentration. Um alle fünf untersuchten Konzentrationen des Phenols bzw. 2,4-DCP gemeinsam zu betrachten, wurden daher im Rahmen einer Diplomarbeit (Köhler 2010) anhand der ermittelten Werte Freundlich-Isothermen erstellt, um mit diesen die Sorptionsgleichgewichte zu beschreiben (Abb. 40).

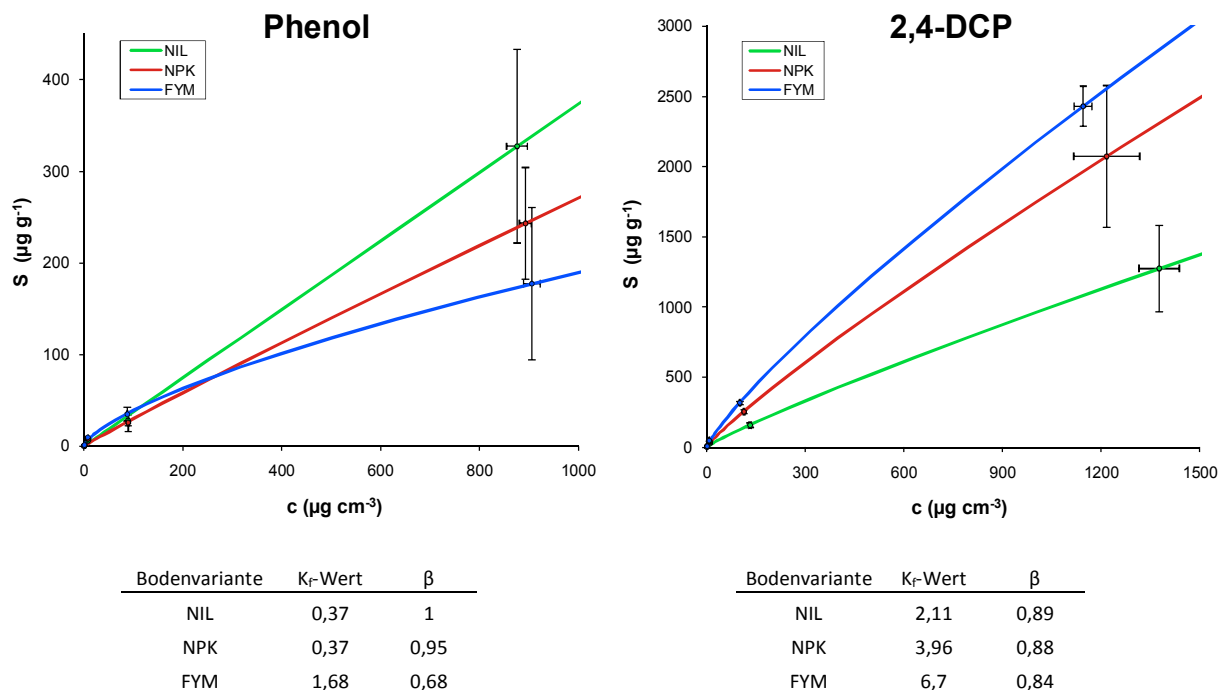


Abb. 40 Freundlich-Sorptionsisothermen ($S = K_f \cdot c^\beta$) und dazugehörige Werte der Sorption von Phenol und 2,4-DCP der drei Bodenvarianten NIL, NPK und FYM (Köhler 2010). S = am Boden sorbierte Menge, K_f = Freundlich-Koeffizient, c = Konzentration in der wässrigen Boden-Lösung, β = Sorptionsintensität.

Die Isothermen wiesen einen linearen Verlauf, wiedergegeben durch die Sorptionsintensitäten (β), auf (Abb. 40). Die K_f -Werte, die die Steilheit der Isothermen beschreiben und daher ein Maß für die Affinität der Schadstoffe zur Bindung an die Bodenpartikel darstellen, korrelierten positiv mit den Kohlenstoffgehalten der Bodenvarianten. Dies bestätigte den Einfluss der organischen Bodensubstanz auf das Sorptionsverhalten von Phenol und 2,4-DCP.

Verteilung von Phenol und 2,4-DCP auf die Korngrößenfraktionen

Zur Beurteilung der Sorption an Korngrößenfraktionen wurden zunächst die absoluten Gehalte der organischen Schadstoffe in den einzelnen Fraktionen ermittelt und diese im Anschluss unter Berücksichtigung der Korngrößenverteilung auf 1 g nicht-fraktionierten Boden bezogen. Aus diesen Werten wurde der prozentuale Anteil der Phenol bzw. 2,4-DCP-Mengen an den insgesamt sorbierten Mengen in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Die Summe der Phenol- bzw. 2,4-DCP-Gehalte der vier Fraktionen wurde dabei als Gesamtgehalt der nicht-fraktionierten Böden angenommen.

Phenol

Die höchsten sorbierten Phenol-Mengen pro Gramm Partikelfraktion wiesen unabhängig von der Bodenvariante die Sand- und Tonfraktionen ($> 63 \mu\text{m}$, $< 2 \mu\text{m}$) auf. Der Gehalt in der Grobschlufffraktion (20-63 μm) war bei allen Varianten am geringsten (Abb. 41).

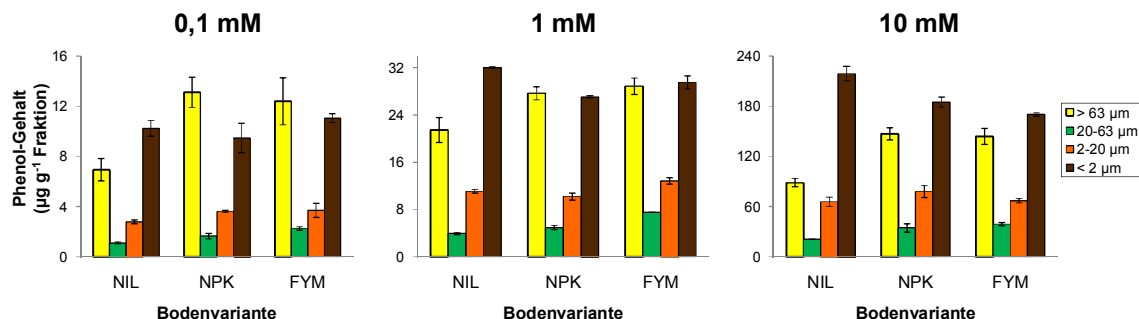


Abb. 41 An den Korngrößenfraktionen der drei Bodenvarianten sorbierte Phenol-Mengen bei zugegebenen Schadstoff-Konzentrationen von 0,1 mM, 1 mM und 10 mM ($n=3$).

Während bei der Variante NIL immer das meiste Phenol an der Tonfraktion zu finden war, veränderte sich das Verhältnis der an der Sand- und Tonfraktion sorbierten Phenol-Mengen bei den Varianten NPK und FYM mit ansteigender Konzentration. So war bei der geringsten Konzentration (0,1 mM) immer mehr Phenol an der Sandfraktion gebunden, während sich bei 10 mM ca. 30 % mehr Phenol am Ton befand. Bei 1 mM Phenol glichen sich die pro Gramm Sand- bzw. Tonfraktion sorbierten Mengen bei den drei Varianten. Bei allen Konzentrationen war ein Zusammenhang zwischen der Sorption an die Korngrößenfraktionen und den organischen Kohlenstoffgehalten festzustellen. Hierbei unterschied sich der Phenol-Gehalt der Variante NIL von denen der beiden anderen, d. h. NPK und FYM. So lag eine signifikant höhere Phenol-Menge in den Korngrößenfraktionen

> 63 μm , 20-63 μm und 2-20 μm der gedüngten Varianten bei der Konzentration 0,1 mM vor. Bei den Konzentrationen 1 und 10 mM wiesen die beiden gröberen Fraktionen (> 63 μm , 20-63 μm) von NPK und FYM höhere Phenol-Gehalte als die der NIL-Variante auf.

Die Phenol-Gehalte waren unter Berücksichtigung der prozentualen Beiträge der jeweiligen Korngrößenfraktionen am Gesamtboden in der Tonfraktion unabhängig von der Konzentration und der jeweiligen Bodenvariante am höchsten (Abb. 42 A). Aufgrund des geringen Anteils der Sandfraktion am nicht-fraktionierten Boden waren hier die geringsten Mengen mit 5 bis 15 % enthalten. In allen Fällen war mit 40 bis 60 % etwa die Hälfte des insgesamt sorbierten Phenols mit der Tonfraktion (< 2 μm) assoziiert (Abb. 42 B). Die zweithöchste Menge wiesen mit 30 bis 50 % die Schlufffraktionen (20-63 μm , 2-20 μm) auf. Die prozentual an den Sandfraktionen gebundene Phenol-Menge verringerte sich bei allen Bodenvarianten mit der Phenolkonzentration der Lösung, wohingegen sie bei der Feinschlufffraktion (2-20 μm) zunahm. Die Anteile der Grobschluff- (20-63 μm) und Tonfraktionen am insgesamt gebundenen Phenol wurden dagegen nicht durch die Konzentration beeinflusst.

Die Phenol-Gehalte der beiden gröberen Fraktionen (> 63 μm , 20-63 μm) korrelierten positiv mit dem C_{org} -Gehalt. So waren die Phenol-Gehalte in den Sandfraktionen der NIL-Variante bei allen Konzentrationsstufen signifikant geringer als die der gedüngten Varianten. Dies spiegelte sich auch in den prozentualen Anteilen wider, der bei NIL um 2 bis 6 % geringer ausfiel als bei NPK/FYM. Das an der Grobschlufffraktion (20-63 μm) gebundene Phenol stieg bei den Konzentrationen 0,1 und 1 mM mit dem Gehalt an organischem Kohlenstoff an. Bei der Konzentration 10 mM wiesen die gedüngten Varianten (NPK, FYM) höhere Phenol-Gehalte als die NIL-Variante auf. Dementsprechend unterschieden sich auch die prozentualen Anteile am Gesamtgehalt (Abb. 42 B). Die Phenol-Sorption an den Feinschlufffraktionen (2-20 μm) zeigte keine eindeutige Abhängigkeit von der Bodenvariante, und somit vom Gehalt an organischem Kohlenstoff. Der Phenol-Gehalt in den Tonfraktionen korrelierte dagegen bei den beiden höheren Konzentrationen (1 mM, 10 mM) negativ mit den organischen Kohlenstoffgehalten.

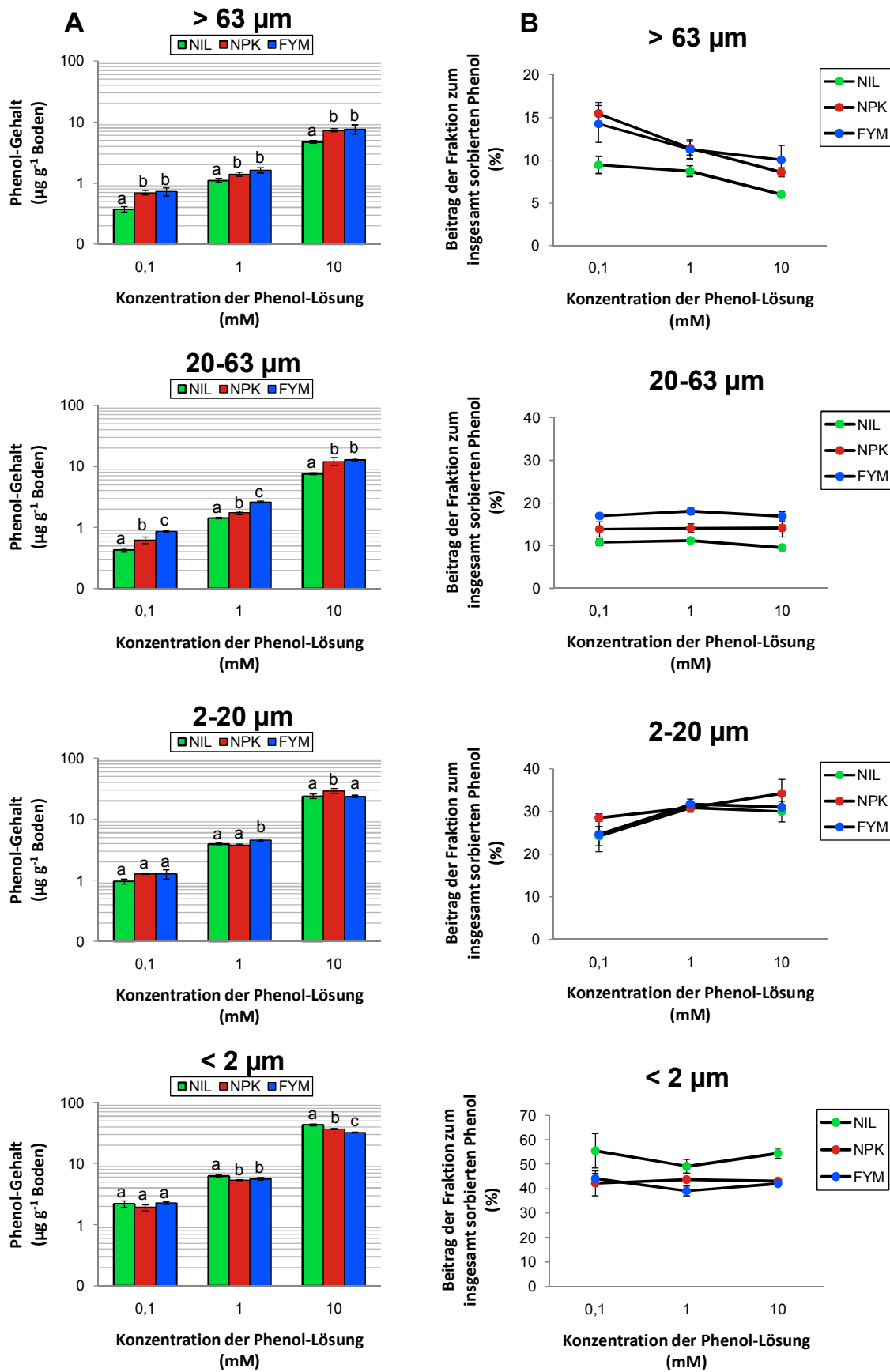


Abb. 42 An den Fraktionen sorbierte Phenol-Mengen der drei Bodenvarianten NIL, NPK, FYM unter Berücksichtigung der Korngrößenverteilung (A) und ihr prozentualer Beitrag zum Gesamtgehalt des Phenols g^{-1} Boden (B) bei zugegebenen Schadstoff-Konzentrationen von 0,1 mM, 1 mM und 10 mM ($n=3$). Kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb jeder Konzentrationsstufe.

2,4-DCP

Den höchsten 2,4-DCP-Gehalt pro Gramm der jeweiligen Fraktionen wiesen unabhängig von der untersuchten Konzentration und der Bodenvariante die Sand- und Tonfraktionen ($> 63 \mu\text{m}$, $< 2 \mu\text{m}$) auf, während die geringsten Mengen in den Schlufffraktionen ($20-63 \mu\text{m}$, $2-20 \mu\text{m}$) zu finden waren (Abb. 43).

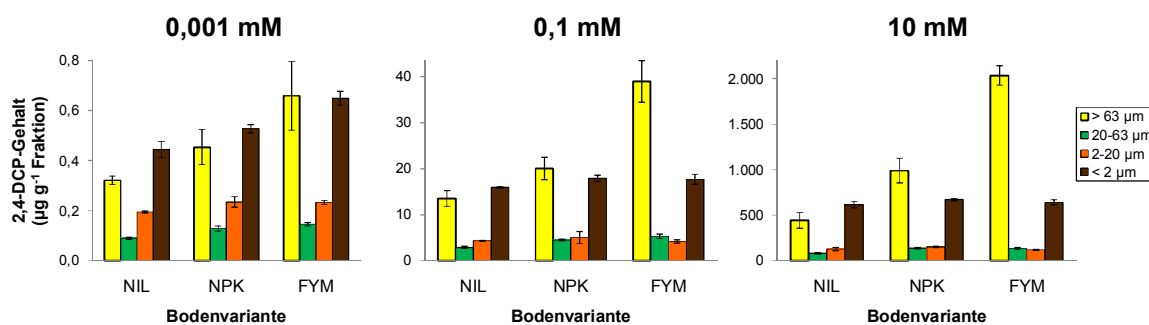


Abb. 43 An den Korngrößenfraktionen der drei Bodenvarianten sorbierte 2,4-DCP-Mengen bei zugegebenen Schadstoff-Konzentrationen von 0,001 mM, 0,1 mM und 10 mM ($n=3$).

Die Mengenverhältnisse des an der Sand- und Tonfraktion gebundenen 2,4-DCP unterschieden sich zwischen den Konzentrationsstufen und den Bodenvarianten. So war der 2,4-DCP-Gehalt der Tonfraktion der NIL-Variante bei einer Konzentration von 0,001 mM höher als jener der Sandfraktion, während bei den beiden höheren Konzentrationen (0,1 mM, 10 mM) kein Unterschied zwischen diesen bestand. Bei der Konzentration 0,001 mM der NPK-Variante ähnelten sich die 2,4-DCP-Gehalte der Sand- und Tonfraktion. Im Gegensatz dazu war die 2,4-DCP-Menge der Sandfraktionen bei den beiden höheren Konzentrationen signifikant höher. Auch bei der FYM-Variante unterschieden sich die 2,4-DCP-Gehalte der Sand- und Tonfraktionen bei der geringsten Konzentration nicht voneinander. Die Sandfraktion wies dagegen bei der Konzentration 0,1 mM etwa die doppelte und bei der Konzentration 10 mM die dreifache 2,4-DCP Menge auf. Bei allen 2,4-DCP-Konzentrationen konnte ein Zusammenhang zwischen der Sorption an die Korngrößenfraktionen und den organischen Kohlenstoffgehalten, wie sie durch die Bodenvarianten vorgegeben waren, festgestellt werden. Bei den niedrigeren Konzentrationen trat dieser Effekt deutlicher hervor als bei den höheren. So war bei der Konzentration 0,001 mM eine positive Korrelation aller Korngrößenfraktionen mit dem Gehalt an organischem Kohlenstoff zu erkennen. Im Gegensatz dazu war ein positiver Zusammenhang bei der Konzentration 0,1 mM nur zwischen den beiden gröberen Fraktionen ($> 63 \mu\text{m}$, $20-63 \mu\text{m}$) und bei der Konzentration 10 mM nur in der Sandfraktion festzustellen.

Unter Berücksichtigung der prozentualen Beiträge der einzelnen Korngrößenfraktionen am Gesamtboden zeigte der Vergleich der 2,4-DCP-Gehalte, dass sich die größten Mengen des 2,4-DCP unabhängig von der Konzentration und der Bodenvariante in den jeweiligen Tonfraktionen befanden (Abb. 44 A). In allen Fällen war etwa die Hälfte des insgesamt sorbierten 2,4-DCP an der Tonfraktion gebunden (Abb. 44 B). Die Sandfraktion wies

aufgrund des geringen prozentualen Anteils dieser Fraktion am nicht-fraktionierten Boden die geringsten Mengen auf und beinhaltete etwa ein Zehntel des sorbierten 2,4-DCP. Ausnahmen bildeten hierbei allerdings die FYM-Variante der Konzentration 0,1 mM und die NPK- und FYM-Varianten der Konzentration 10 mM. Bei den ersten beiden lag der Anteil des am Sand gebundenen 2,4-DCP jeweils bei einem Fünftel. Bei der FYM-Variante mit einer Anfangskonzentration von 10 mM 2,4-DCP war der 2,4-DCP-Gehalt der Sandfraktion höher als der der Schlufffraktionen (20-63 μm , 2-20 μm) und entsprach etwa einem Drittel der an allen vier Fraktionen gebundenen 2,4-DCP Menge.

Insgesamt korrelierten die 2,4-DCP-Gehalte positiv mit dem organischen Kohlenstoffgehalt, wie dieser durch die Bodenvarianten und ihrer jeweiligen Korngrößenfraktionen vorgegeben war. So nahmen die Gehalte der Sandfraktion konzentrationsunabhängig mit dem Kohlenstoffgehalt zu. Gleichzeitig stieg der prozentuale Anteil des Sandes an dem insgesamt gebundenen 2,4-DCP (Abb. 44). Auch die Sorption an der Grobschlufffraktion (20-63 μm) wurde durch den unterschiedlichen Kohlenstoffgehalt beeinflusst. So wies die NIL-Variante dieser Fraktion bei allen Konzentrationen einen signifikant geringeren 2,4-DCP-Gehalt als die gedüngten Varianten (NPK, FYM) auf. Der prozentuale Anteil des an der Fraktion 20-63 μm gebundenen 2,4-DCP war bei der NIL-Variante ebenfalls tendenziell und für die Anfangskonzentration von 0,1 mM auch signifikant geringer. Bei der Feinschlufffraktion (2-20 μm) war dagegen kein eindeutiger Einfluss des Kohlenstoffgehalts zu erkennen. Der prozentuale Anteil des an dieser Fraktion gebundenen 2,4-DCP nahm jedoch mit steigender Anfangskonzentration ab. Die an den Ton gebundenen 2,4-DCP-Mengen waren ähnlich und wiesen nur bei den Konzentrationen 0,001 mM und 0,1 mM signifikante Unterschiede auf. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die prozentualen Anteile des an die Tonfraktion gebundenen 2,4-DCP mit ansteigender Konzentration in Abhängigkeit vom organischen Kohlenstoff. So war bei den Varianten NIL und NPK ein Anstieg mit der Konzentration zu erkennen, während sich der prozentuale Anteil der FYM-Variante verringerte. Dies lässt sich durch den erhöhten 2,4-DCP-Gehalt der Sandfraktionen der Varianten NPK und FYM bei höheren Konzentrationen erklären, wodurch sich der prozentuale Anteil an den Tonfraktionen bei diesen Bodenvarianten trotz der ähnlichen Gehalte g^{-1} Boden änderte.

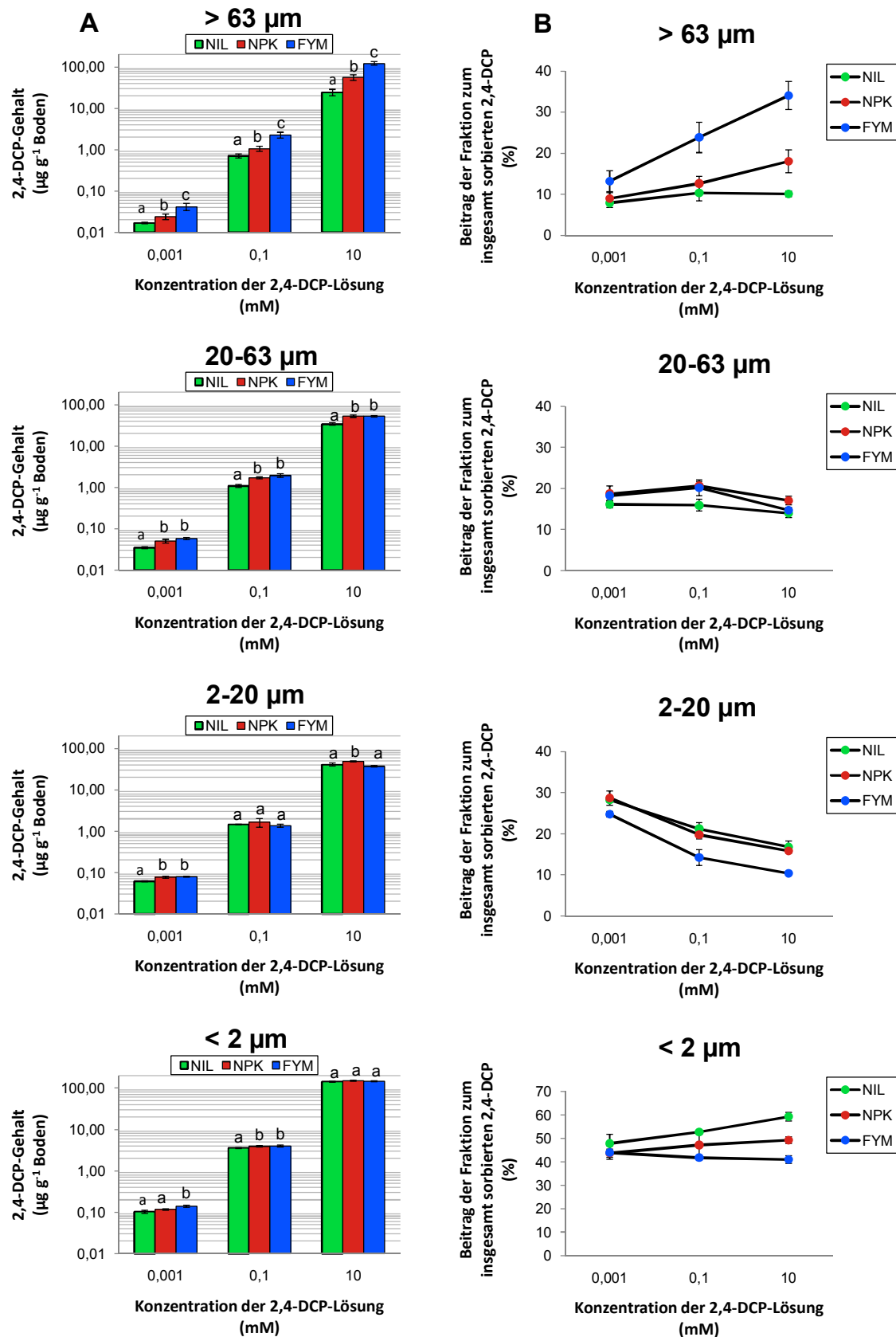


Abb. 44 An den Fraktionen sorbierte 2,4-DCP-Mengen der drei Bodenvarianten NIL, NPK, FYM unter Berücksichtigung der Korngrößenverteilung (A) und ihr prozentualer Beitrag zum Gesamtgehalt des 2,4-DCP g^{-1} Boden (B) bei zugegebenen Schadstoff-Konzentrationen von 0,001 mM, 0,1 mM und 10 mM ($n=3$). Kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb jeder Konzentrationsstufe.

Zwar zeigten die Sorptionsversuche mit nicht-fraktioniertem Boden, dass bei gleichen Konzentrationen insgesamt deutlich weniger Phenol als 2,4-DCP an den Boden gebunden wurde (siehe oben), in ihrem generellen Sorptionsverhalten an Korngrößenfraktionen verhielten sich beide organische Schadstoffe jedoch sehr ähnlich. So waren bei den Konzentrationen 0,1 mM und 10 mM 40 bis 60 % der Substanzen mit der Tonfraktion assoziiert. Auch der Einfluss des organischen Kohlenstoffs auf die Sorption der Substanzen war vergleichbar. So gab es in beiden Fällen eine positive Korrelation mit dem Kohlenstoffgehalt in den gröberen Fraktionen ($> 63 \mu\text{m}$, $20\text{-}63 \mu\text{m}$), während die Sorption an den feineren Fraktionen ($2\text{-}20 \mu\text{m}$, $< 2 \mu\text{m}$) unverändert blieb oder abnahm. Die Konzentration der Substanzen beeinflusste das Sorptionsverhalten der beiden organischen Schadstoffe dagegen auf eine sehr unterschiedliche Weise: so sank mit steigenden Phenolkonzentrationen die prozentual an die Sandfraktionen gebundene Menge, während die am Ton abnahm. Beim 2,4-DCP verhielt es sich genau umgekehrt.

Im Waschwasser nachgewiesene Phenol- und 2,4-DCP-Gehalte zeigten, dass während der Fraktionierung und Aufarbeitung auch eine Ablösung (Desorption) beider Substanzen von den Bodenfraktionen stattfand (Finke 2009, Köhler 2010). Die Verluste betrugen dabei abhängig von den Anfangskonzentrationen und Bodenvarianten bzw. Korngrößenfraktionen zwischen 34 und 67 % für Phenol bzw. zwischen 40 und 70 % für 2,4-DCP.

3.4.2 Mikrobieller Abbau von Phenol und 2,4-DCP in den Bodenvarianten

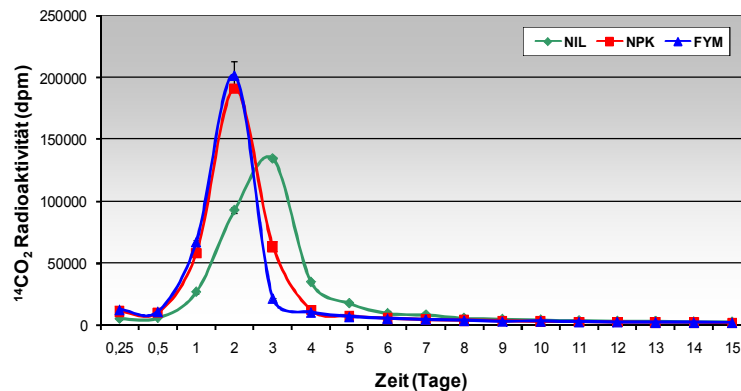
Um den mikrobiellen Abbau von Phenol und 2,4-DCP verfolgen zu können, wurden Inkubations-Experimente mit den entsprechenden uniform ^{14}C -markierten Substanzen durchgeführt (2.4.1). Dafür wurden 5 mM (entsprechend für Phenol $0,531 \text{ mg ml}^{-1}$ Bodenlösung und $0,098$ bis $0,111 \text{ mg g}^{-1}$ Boden bzw. für 2,4-DCP $0,875 \text{ mg ml}^{-1}$ Bodenlösung und $0,167$ bis $0,199 \text{ mg g}^{-1}$ Boden) zu Bodenmikrokosmen gegeben. Die Mineralisation der Verbindungen wurde in diesen über die kontinuierliche Messung des freiwerdenden $^{14}\text{CO}_2$ charakterisiert. Durch die Bestimmung des im Boden verbliebenen ^{14}C am Inkubationsende konnten die Wiederauffindungsraten zur Bilanzierung des gesamten ^{14}C aus den zugesetzten Verbindungen bestimmt werden. Bei der im Boden verbliebenen ^{14}C -Fraktion wurde außerdem zwischen der in Biomasse eingebauten ^{14}C -Aktivität und der im Boden verbliebenen Restaktivität unterschieden.

Phenol-Abbau

Phenol wurde in allen Bodenvarianten nach einer Anlaufphase von nur 12 Stunden abgebaut. Nach 6 Tagen erfolgte nur noch ein geringfügiger Abbau. Bis zur Beendigung der Inkubation nach 15 Tagen fanden sich insgesamt 25 bis 30 % der zugesetzten ^{14}C -Aktivität als CO_2 wieder (Abb. 45). Die beiden Bodenvarianten mit höherem organischen Kohlenstoffgehalt (NPK, FYM) wiesen ähnlich hohe maximale Phenol-Abbauraten, die über denen der NIL-Variante lagen, auf. Der Abbau in der NIL-Variante erfolgte mit einer Zeitverzögerung von etwa 24 Stunden. Die kumulativen Daten belegten, dass nach 15 Tagen

die Abbauleistung von NPK und NIL gleich war und die von FYM geringfügig, aber signifikant, niedriger (Abb. 45 B).

A



B

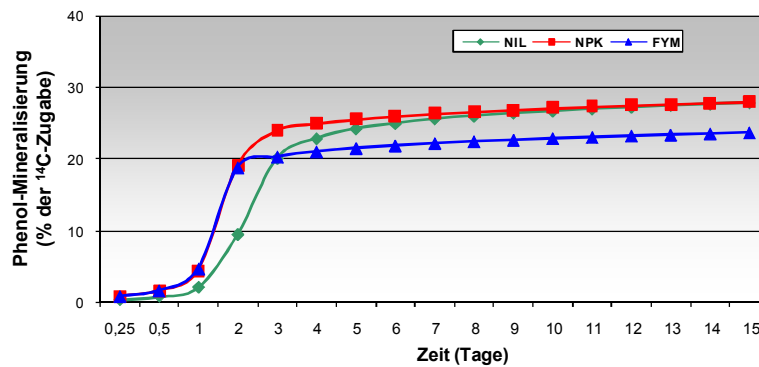


Abb. 45 Phenol-Abbauraten in den Bodenvarianten NIL, NPK und FYM. Darstellung der als $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzten Radioaktivität (A) und des kumulativen Abbaus (B) ($n=4$). Die Streuung der Wiederholungen lag bei (B) im Bereich der Größe der verwendeten Symbole und wurde daher nicht eingezeichnet.

Am Ende der Inkubation, nach 15 Tagen, konnten insgesamt 91 bis 92 % der ursprünglich zugegebenen ^{14}C -Menge als $^{14}\text{CO}_2$, im Boden und in der Biomasse wiedergefunden werden (Tab. 44). Die Summenbilanz zeigte, dass unabhängig von der Bodenvariante etwa zwei Drittel des ^{14}C -Phenols bzw. dessen Abbauprodukte im Boden verblieben, wobei sich davon etwa ein Dreißigstel in der Biomasse wiederauffand. Die Verluste von 8 bis 9 % der ^{14}C -Aktivität sind auf die notwendige Trocknung der Bodenproben vor der Verbrennung (vgl. 2.4.3.3), bei denen ein Teil der Substanz wieder freigesetzt wird, und eine kumulative Messungenauigkeit von ca. 2 % zurückzuführen.

Tab. 44 Verteilung und Wiederauffindungsrate des ^{14}C nach 15 d Inkubation mit ^{14}C -Phenol. Kleine hochgestellte Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Bodenvarianten.

		NIL	NPK	FYM
Freigesetztes CO_2	%	$28,0 \pm 0,3^a$	$28,0 \pm 1,5^a$	$23,7 \pm 0,8^b$
Boden	%	$64,1 \pm 2,8^a$	$64,2 \pm 2,8^a$	$67,5 \pm 1,0^b$
Biomasse	%	$2,2 \pm 0,1^a$	$2,3 \pm 0,1^a$	$2,1 \pm 0,1^a$
Wiederauffindungsrate	%	$92,1 \pm 2,8^a$	$92,2 \pm 3,2^a$	$91,2 \pm 1,3^a$

2,4-DCP-Abbau

Der Abbau von 2,4-DCP erfolgte in den drei verschiedenen Bodenvarianten mit deutlich unterschiedlicher Rate (Abb. 46).

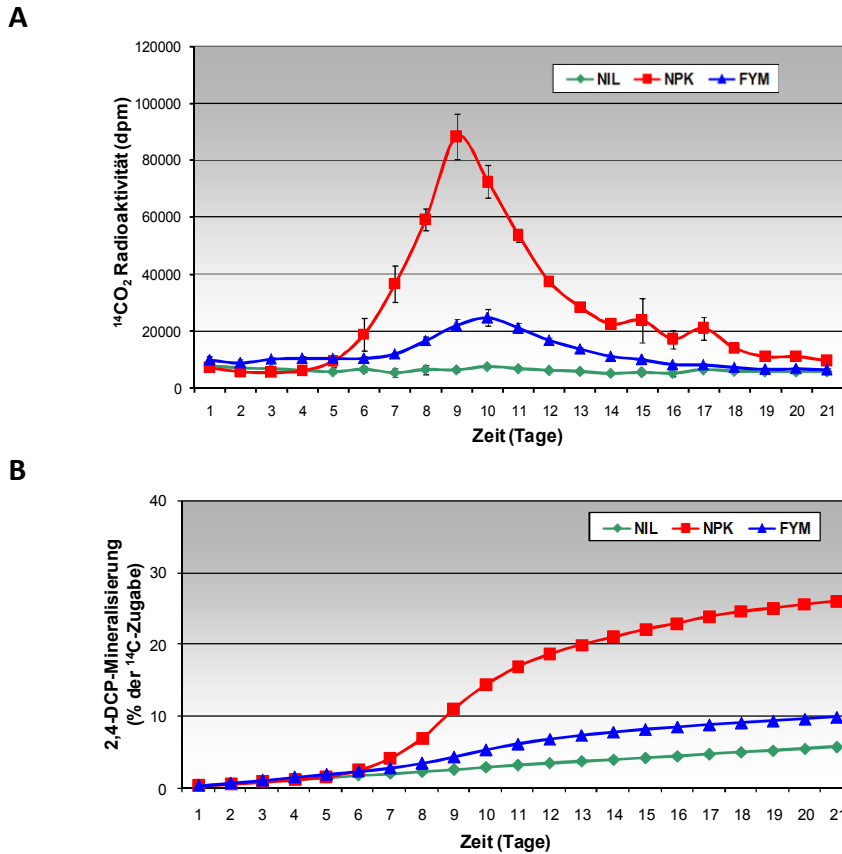


Abb. 46 2,4-DCP-Abbauraten in den Bodenvarianten NIL, NPK und FYM. Darstellung der als $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzten Radioaktivität (A) und des kumulativen Abbaus der Verbindung (B) ($n=4$). Die Streuung der Wiederholungen bei (B) lag im Bereich der Größe der verwendeten Symbole und wurde daher hier nicht eingezeichnet.

Die höchsten Abbauraten und der stärkste Abbau kumulativ über 21 Tage wurde für die NPK-Variante ermittelt. Der Abbau stieg bei dieser nach einer inaktiven Anlaufphase von fünf Tagen ab dem 6. bis zum 9. Tag stark an und sank danach kontinuierlich bis auf ein relativ konstantes Grundniveau mit niedrigen Abbauraten nach 19 Tagen. Bei der FYM-Variante begann der Abbau nach etwa sieben Tagen, stieg geringfügig bis zum 10. Tag an und nahm dann kontinuierlich bis zum Ende der Inkubationen, nach 21 Tagen, auf ein Niveau unterhalb des Niveaus der NPK-Variante ab. Die maximalen Abbauraten in der FYM-Variante entsprachen etwa einem Viertel des Höchstwertes der NPK-Variante. Die NIL-Variante wies bis zum Ende des Versuchs eine im Vergleich zu den beiden anderen Varianten niedrigere Abbaukinetik auf. Es war lediglich eine geringe Grundaktivität, die zu einem Abbau von insgesamt etwa 6 % nach 21 Tagen führte, erkennbar. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese niedrigen Abnahmeraten bei NIL nicht durch mikrobiellen Abbau sondern allein durch die Diffusion auf Grund des hohen Dampfdrucks der Ausgangssubstanz selber, also des 2,4-DCP, in die Natronlage verursacht wurden (8 Pa

bei 20 °C). Im Gegensatz dazu waren bei der FYM-Variante nach 21 Tagen bereits 10 % und bei der NPK-Variante 28 % zu CO₂ umgewandelt. Der Einbau von ¹⁴C in die mikrobielle Biomasse korrelierte mit den ermittelten Abbauaktivitäten: Der höchste Einbau von 0,64 % wurde bei der Bodenvariante NPK bestimmt, etwa halb so viel bei der FYM-Variante und 4,3-fach weniger bei NIL (Tab. 45).

Tab. 45 Verteilung und Wiederauffindungsrate des ¹⁴C nach 21 d Inkubation mit ¹⁴C-2,4-DCP. Kleine hochgestellte Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen den Bodenvarianten.

		NIL	NPK	FYM
Freigesetztes CO ₂	%	5,8 ± 0,2 ^a	26,0 ± 0,8 ^b	9,8 ± 0,2 ^c
Boden	%	93,8 ± 0,7 ^a	66,8 ± 1,2 ^b	85,8 ± 0,6 ^c
Biomasse	%	0,15 ± 0,03 ^a	0,64 ± 0,05 ^b	0,33 ± 0,02 ^c
Wiederauffindungsrate	%	99,5 ± 0,7 ^a	92,9 ± 1,5 ^b	95,7 ± 0,7 ^c

Im Folgenden sollte der Unterschied zwischen den hohen 2,4-DCP Abbauraten von NPK im Vergleich zu den Varianten FYM und NIL analysiert werden. Um zu überprüfen, ob diese Unterschiede auf Stickstoff-Limitierungen beruhten, wurde eine Inkubation der NIL und FYM-Varianten unter gleichen Bedingungen wie zuvor, aber mit Zugabe einer Minerallösung (NPK-Flüssigdünger), durchgeführt. Die Menge der zugegebenen Nährstoffe aus dem Dünger wurde dabei anhand einer durchschnittlich zu einem Feld zugegebenen Menge von 100 kg N pro ha Boden berechnet (vgl. 2.4.1).

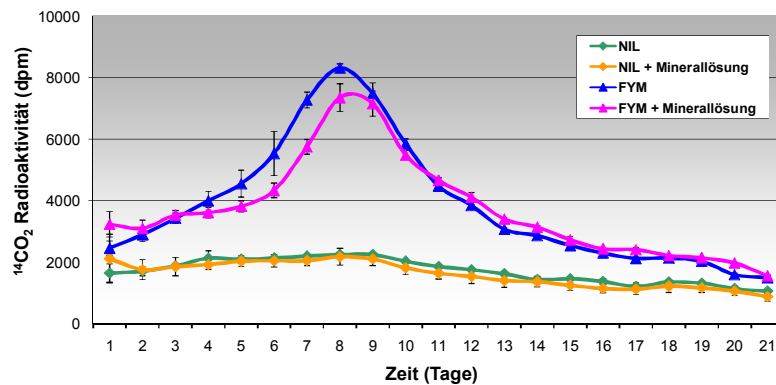


Abb. 47 2,4-DCP-Abbauraten der Bodenvarianten NIL und FYM mit und ohne Zugabe einer Minerallösung (n=4).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Zugabe der mineralischen Nährstofflösung tatsächlich keinen Einfluss auf die Abbauraten hatte (Abb. 47). Auch in ihrer Summenbilanz waren keine Unterschiede festzustellen (Tab. 46). Damit kann ausgeschlossen werden, dass der geringere mikrobielle Abbau von 2,4-DCP in den Varianten NIL und FYM im Vergleich zur NPK-Variante auf einen akuten Nährstoffmangel für die Mikroorganismen zurückzuführen war.

Tab. 46 Verteilung und Wiederauffindungsrate des ^{14}C nach 21 d Inkubation mit ^{14}C -2,4-DCP mit und ohne Zugabe einer Minerallösung (ML). Kleine hochgestellte Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Bodenvarianten.

		NIL ohne	NIL+ML	FYM ohne	FYM+ML
Freigesetztes CO_2	%	$6,0 \pm 0,1^a$	$5,6 \pm 0,2^a$	$11,8 \pm 0,2^b$	$11,5 \pm 0,1^b$
Boden	%	$85,2 \pm 0,3^a$	$85,7 \pm 0,3^a$	$78,6 \pm 0,7^b$	$78,9 \pm 0,4^b$
Wiederauffindungsrate	%	$91,2 \pm 0,3^a$	$91,3 \pm 0,4^a$	$90,4 \pm 0,7^a$	$90,4 \pm 0,4^a$

Eine weitere Ursache für die Unterschiede in den 2,4-DCP-Abbauraten der verschiedenen Bodenvarianten könnte in einer unterschiedlichen toxischen Wirkung des 2,4-DCP auf die Bodenmikroorganismen beruhen. Um dies zu untersuchen, wurde der Einfluss von 2,4-DCP auf die Basalatmung durch Messung des freiwerdenden CO_2 (2.3.3) der drei Bodenvarianten untersucht. Kontrollen wurde anstatt 5 mM 2,4-DCP destilliertes Wasser zugesetzt.

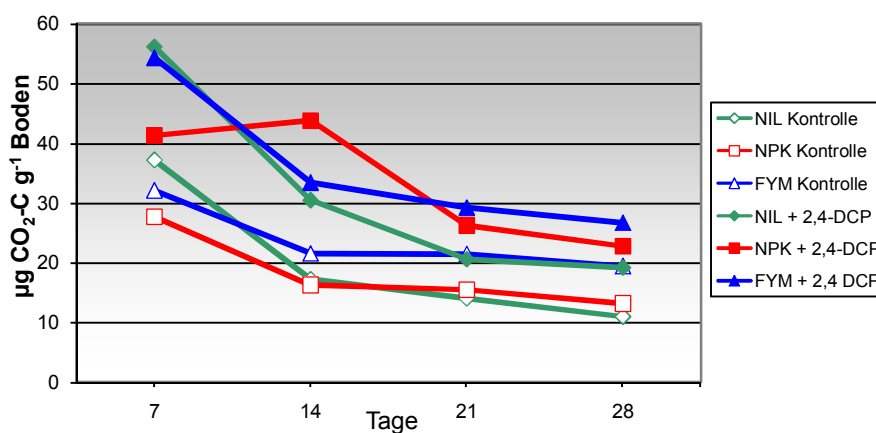


Abb. 48 Gesamt- CO_2 Freisetzungsraten der Bodenvarianten mit und ohne 2,4-DCP-Zugabe ($n=3$). Die zugegebene 2,4-DCP Konzentration betrug 5 mM, entsprechend $0,815 \text{ mg ml}^{-1}$ Bodenlösung und $0,159$ bis $0,181 \text{ mg g}^{-1}$ Boden. Die Streuung der Wiederholungen lag im Bereich der Größe der verwendeten Symbole und wurde daher nicht eingezeichnet.

Die Basalatmung lag mit 10 bis $60 \mu\text{g CO}_2\text{-C g}^{-1}$ Boden (Abb. 48) in einem bereits bei früheren Untersuchungen mit dem Bad Lauchstädt Boden ermittelten Bereich (R. Martens, persönliche Mitteilung). Die gebildeten CO_2 -Mengen nahmen über den Inkubationsverlauf von vier Wochen langsam aber kontinuierlich ab. Dies ist für Böden unter den gegebenen Inkubationsbedingungen typisch und kann auf eine Nährstofffreisetzung aus den Bodenaggregaten in Folge der Durchmischung vor Versuchsbeginn zurückgeführt werden (Madsen 1996). Die Zugabe des 2,4-DCP erhöhte die gebildete CO_2 -Menge bei allen drei Bodenvarianten deutlich. Diese stieg nach 7 Tagen um das 1,4-fache bei NPK, das 1,5-fache bei NIL und das 1,7-fache bei FYM. Ähnlich wie bei den Kontrollen sank die gebildete CO_2 -Menge bei NIL und FYM ab der zweiten Woche kontinuierlich ab. Der Unterschied zu den Kontrollen blieb jedoch auch nach 28 Tagen erhalten und betrug das 1,4-fache bei FYM bzw. das 1,7-fache bei NIL. Die NPK-Variante wies in der zweiten Woche einen höheren Wert an gebildetem CO_2 im Vergleich zur ersten Woche auf, d. h. das 2,8-fache im Vergleich zur Kontrolle. Dies könnte durch den erhöhten Abbau des 2,4-DCP hervorgerufen worden sein, die in diesem Zeitraum fiel (Abb. 46). In der dritten Woche sank die gebildete CO_2 -Menge auch bei NPK ab und befand sich wieder auf dem im Vergleich zur Kontrolle

zuvor beobachteten Niveau, d. h. 1,7-fach über der Basalatmung ohne Zusatz von 2,4-DCP. Dieser Unterschied blieb auch in der vierten Woche erhalten. Der in allen mit 2,4-DCP versetzten Böden zu beobachtende Anstieg an CO₂ könnte auf einen toxischen Effekt hinweisen, der zu einer erhöhten, sog. Stressatmung führt (Escher *et al.* 1997). Allerdings erklären die unterschiedlichen Effekte nicht eindeutig den Grund eines niedrigeren Abbaus von 2,4-DCP im FYM-Boden im Vergleich zur NPK-Variante oder gar den vollständig fehlenden Abbau in der NIL-Variante.

3.4.3 Nachweis und phylogenetische Charakterisierung von Mikroorganismen, die am Abbau von Phenol und 2,4-DCP im Boden beteiligt sind

Um die am Abbau von Phenol bzw. 2,4-DCP beteiligten Bakterien und Pilze in den unterschiedlichen Bodenvarianten (NIL, NPK, FYM) nachzuweisen, wurden die ¹³C-markierten Verbindungen in Bodeninkubationen eingesetzt, um anschließend aus der direkt extrahierten Boden-DNA die ¹³C-markierten Fraktionen nach Dichtegradienten-Zentrifugationen zu gewinnen. Dieses Verfahren, das *stable isotope probing* (SIP), erlaubt es, unabhängig von Kultivierungen am Abbau beteiligte Mikroorganismen zu detektieren und über DNA-Sequenzierung zu charakterisieren (vgl. 2.5.7). Auf die Untersuchung der *Archaea* wurde in diesem Zusammenhang verzichtet, da aufgrund der bekannten Physiologie dieser Organismen nicht mit einer direkten Beteiligung an derartigen Abbauprozessen zu rechnen war (vgl. 1.3). Die Inkubation der Böden mit den isotopisch markierten und, zur Kontrolle, nicht markierten Substanzen erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei den Abbaubersuchen (vgl. 3.4.2). Die Zeitpunkte für die Probenahmen wurden auf Grundlage der Abbaukurven (Abb. 45, Abb. 46) ausgewählt. Bei jeder Probennahme wurden drei parallele Ansätze von 5 g Boden von jeder Bodenvariante analysiert. Die Anfangskonzentration bezogen auf das Bodenwasser betrug 5 mM Phenol bzw. 2,4-DCP. Dies entsprach für Phenol 0,088 bis 0,108 mg g⁻¹ Boden und für 2,4-DCP 0,159 bis 0,194 mg g⁻¹ Boden. Da beim 2,4-DCP nur bei der NPK- und FYM-Variante ein Abbau erfolgte, wurde auf die Inkubation der NIL-Variante mit ¹³C-2,4-DCP verzichtet. Um die ¹³C-inkorporierte DNA eindeutig zu erkennen, wurden zeitgleich Kontrollansätze mit nicht markiertem Phenol bzw. 2,4-DCP inkubiert. Nach Abstoppen der Inkubation durch Einfrieren der Böden wurden aus jeder Parallele zweimal 0,5 g Boden für die DNA-Extraktionen entnommen. Insgesamt 600 ng DNA aus den kombinierten DNA-Extrakten der drei Parallelen wurden dann in einer CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die Gradienten wurden anschließend in Fraktionen separiert. Nach Fällung der DNA konnten dann mit der PCR-SSCP Methode (2.5.8) vergleichende Profile dieser Fraktionen erstellt werden. Die am Abbau beteiligten Mikroorganismen sollten dabei aufgrund des Einbaus von ¹³C in ihre DNA in Gradientenfraktionen mit einer höheren Dichte, d. h. bei ca. 1,72 g ml⁻¹ zu finden sein. Um die am Abbau beteiligten Mikroorganismen zu identifizieren, wurden Banden aus schweren Fraktionen der Gele, die nicht in den Kontrollen ohne ¹³C-Isotope auftraten, ausgeschnitten. Nach Klonierung in *E. coli* wurde die DNA-Sequenz der amplifizierten SSU rRNA-Gene analysiert (2.5.11).

Phenol-Abbau durch Bacteria

Ein Einbau von ^{13}C aus dem Phenol in *Bacteria*-DNA konnte bei allen drei Bodenvarianten bereits nach 48 h Inkubation beobachtet werden. Vor diesem Zeitpunkt waren dagegen keine Banden, d. h. PCR-amplifizierte SSU rRNA-Gene, in den SSCP-Profilen der Fraktionen mit einer Dichte um $1,72 \text{ g ml}^{-1}$ erkennbar (Abb. 49).

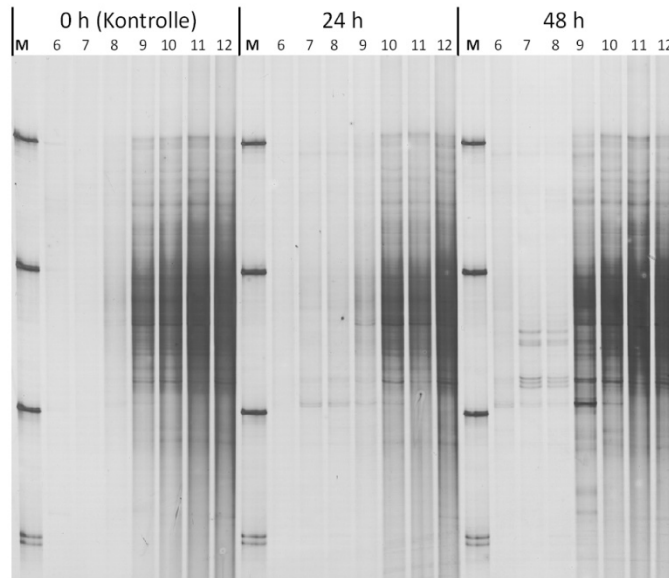


Abb. 49 SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der *Bacteria* aus DNA-Extrakten der Gradientenfraktionen nach 0 h, 24 h und 48 h Inkubation mit ^{13}C -Phenol zur Darstellung des Zeitverlauf des ^{13}C -Einbaus in die DNA bei der NPK-Variante. Die Dichte der Gradientenfraktionen (6 bis 12) nahm mit ansteigender Nummerierung ab. M=SSCP-Marker.

Die Kontrollen mit nicht markiertem Phenol wiesen weder nach 4, noch nach 7 Tagen Banden in den schwereren Gradientenfraktionen auf. Im Gegensatz dazu waren bei den ^{13}C -Profilen spezifische Banden in Fraktionen mit einer Dichte um $1,72 \text{ g ml}^{-1}$ deutlich zu erkennen (Abb. 50).

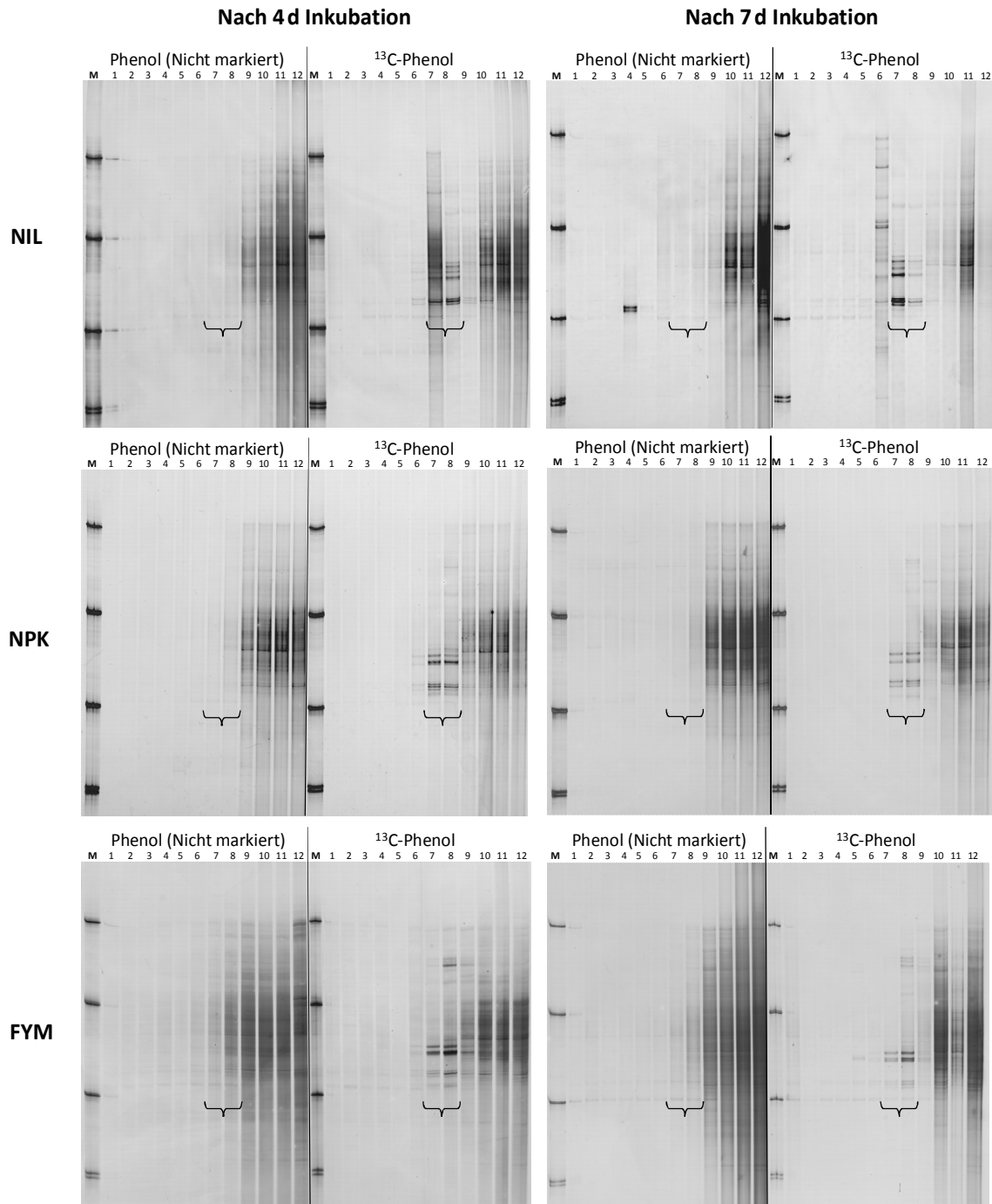


Abb. 50 SSCP-Profil von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der *Bacteria* aus DNA-Extrakten der Gradientenfractionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach 4 und 7 d Inkubation mit nicht markiertem bzw. ¹³C-Phenol. Die Dichte der Gradientenfractionen (1 bis 12) nahm mit ansteigender Nummerierung ab. M=SSCP-Marker. Fractionen mit einer Dichte um 1,72 g ml⁻¹ wurden mit einer geschweiften Klammer markiert.

In allen Bodenvarianten waren nur wenige Banden in den SSCP-Gelen sichtbar, die auf aktiv abbauende Bakterien hindeuten. Die SSCP-Profile nach 4 und 7 Tagen ähnelten sich, d. h. sie wiesen die gleichen Banden auf (Abb. 51).

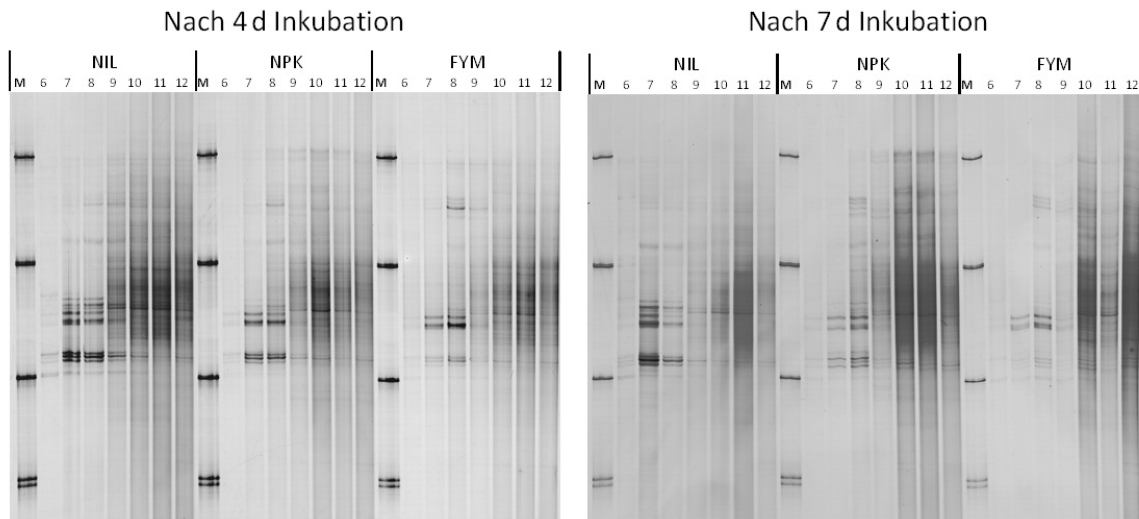


Abb. 51 SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der *Bacteria* aus DNA-Extrakten der Gradientenfractionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach 4 und 7 d Inkubation mit ^{13}C -Phenol. Die Dichte der Gradientenfractionen (6 bis 12) nahm mit ansteigender Nummerierung ab. M=SSCP-Marker. Fractionen mit einer Dichte um $1,72 \text{ g ml}^{-1}$ wurden mit einer geschweiften Klammer markiert.

Für die Varianten NIL und FYM wurde auch eine Untersuchung nach 14-tägiger Inkubation durchgeführt. Hierbei zeigten sich die gleichen Banden wie zuvor (Abb. 52). Die unteren Banden schienen mit zunehmendem Gehalt an organischem Kohlenstoff in den Bodenvarianten (NIL < NPK < FYM) schwächer zu werden. Dieser quantitative Unterschied war sowohl nach 4 und 7 als auch nach 14 Tagen zu erkennen.

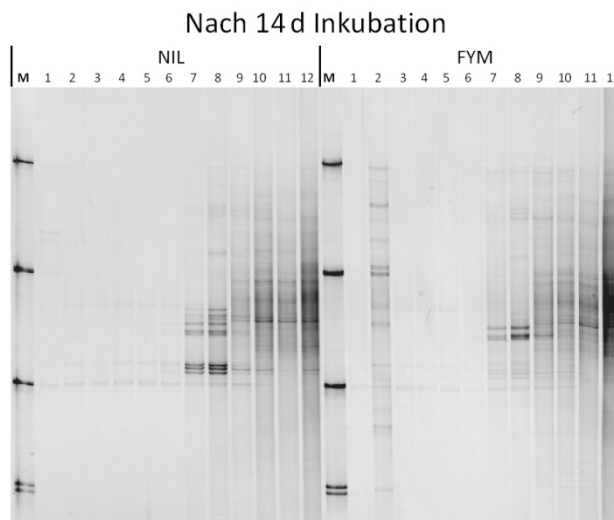


Abb. 52 SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der *Bacteria* aus DNA-Extrakten der Gradientenfractionen der Bodenvarianten NIL und FYM nach 14 d Inkubation mit ^{13}C -Phenol. Die Dichte der Gradientenfractionen (1 bis 12) nahm mit ansteigender Nummerierung ab. M=SSCP-Marker.

Um die für den Phenol-Abbau verantwortlichen *Bacteria* zu identifizieren, wurden aus den SSCP-Profilen der schweren Gradientenfractionen Banden zur Sequenzierung, wie in der Abbildung 53 markiert, ausgewählt.

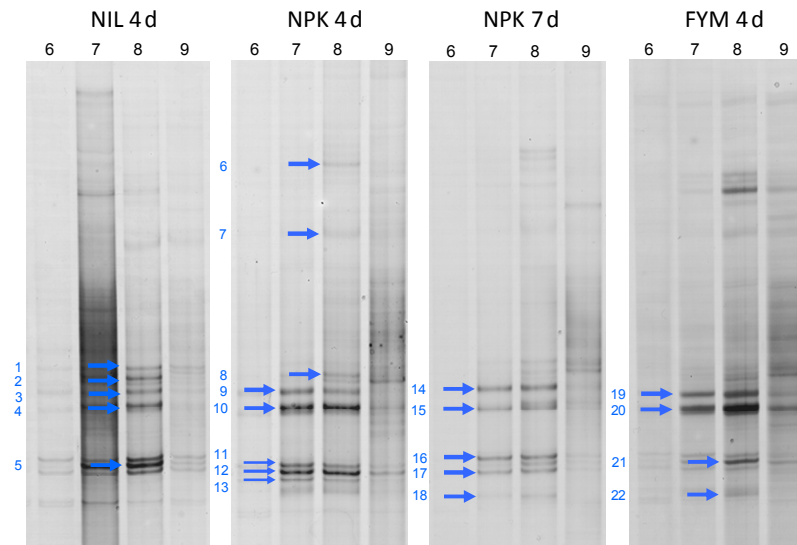


Abb. 53 Zur Sequenzierung ausgewählte Banden aus den *Bacteria* SSCP-Profilen (^{13}C -Phenol).

Die DNA-Sequenzierung der Banden und ihre phylogenetische Analyse zeigten, dass alle dominanten Banden entweder hohe Ähnlichkeiten zu Sequenzen von *Rhodococcus* sp. oder *Arthrobacter* sp. aufwiesen. Weitere eher schwächer ausgeprägte Banden zeigten eine enge Verwandtschaft zu *Pseudomonas* sp., *Blastococcus* sp. sowie Vertretern der *Oxalobacteraceae* (Tab. 47).

Tab. 47 Phylogenetische Zuordnung der SSU rRNA-Sequenzen der Banden von ^{13}C -Phenol *Bacteria* SSCP-Profilen zu Einträgen der NCBI-Datenbank (BLAST-Analyse).

Bande	Länge der Partialsequenz	phylogenetische Einordnung	Nächster Verwandter in NCBI-Datenbank	Accession No.	% Ähnlichkeit
1	373	Bacteria	<i>Uncultured Bacterium</i>	GQ472363	95
2,8	372	Actinobacteria	<i>Blastococcus</i> sp.*	AM936514*	99
3,4,9,10, 14,15,19,20	371	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i> sp.*	CP000431*	99 - 100
5, 11, 12, 13, 16, 17, 21	372	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp.*	AB531417*	99 - 100
6	370	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.*	FJ889294*	100
7	369	Betaproteobacteria	<i>Variovorax</i> sp.*	DQ118732*	100
18, 22	369	Betaproteobacteria	<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> *	AY624622*	100

*= mehr als eine Übereinstimmung in der NCBI-Datenbank, ein repräsentatives Beispiel angegeben

Um die Hinweise auf quantitative Veränderungen, wie sie bei den unterschiedlich ausgeprägten Bandenintensitäten der SSCP-Gele beobachtet wurden, zu überprüfen, wurden zusätzlich Klon-Bibliotheken der SSU rRNA-Gene aus den schweren Gradientenfraktionen der Inkubationen von NIL, NPK und FYM nach 4 Tagen erstellt und phylogenetisch analysiert (vgl. 2.5.11.2) (Abb. 54, Anhang Tab. 61-63).

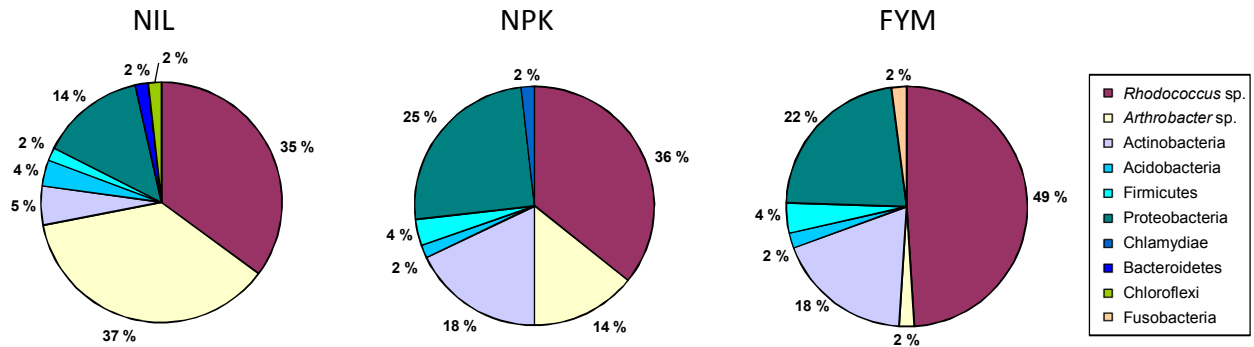


Abb. 54 Zusammensetzung der *Bacteria*-Klon-Bibliotheken aus schweren Gradientenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach 4 d Inkubation mit ^{13}C -Phenol. Die Ergebnisse beruhen auf der Auswertung von 57 (NIL), 56 (NPK) bzw. 49 (FYM) Klonsequenzen.

Die Ergebnisse bestätigten die Dominanz von Sequenzen mit höchsten Ähnlichkeiten zu *Rhodococcus* sp. und *Arthrobacter* sp., die zusammen 49 bis 71 % der gefundenen Sequenzen ausmachten. Die weiteren gefundenen Einzelsequenzen waren vor allem Organismen aus den Phyla der Actinobacteria sowie der Proteobacteria zuzuordnen. Der prozentuale Anteil an *Rhodococcus*-verwandten Sequenzen war bei NIL und NPK identisch, bei FYM war er höher. Im Gegensatz dazu zeigte die Anzahl der *Arthrobacter*-Sequenzen eine negative Korrelation mit dem Kohlenstoffgehalt des Bodens, da dieser von NIL über NPK zu FYM deutlich abnahm. Dies bestätigte die auf den SSCP-Gelen erkennbaren quantitativen Unterschiede der Banden bei den verschiedenen Bodenvarianten. D. h. der organische Kohlenstoff, wie er in den drei Bodenvarianten vorgegeben war, hatte offensichtlich zwar keinen Effekt auf die qualitative Zusammensetzung der Phenol-abbauenden Bakterien-Gemeinschaft, dafür aber auf deren quantitative Zusammensetzung. *Rhodococcus* schien bei höheren C_{org} -Gehalten im Vorteil, während *Arthrobacter* niedrigere C_{org} -Gehalte bevorzugte.

Phenol-Abbau durch Fungi

Aus den gleichen Fraktionen der SIP-Gradienten wurden neben den SSU rRNA-Genen der *Bacteria* auch die der *Fungi* untersucht. Auch hier konnten PCR-Produkte in den schweren Dichtefractionen mit $1,72 \text{ g ml}^{-1}$ nachgewiesen werden. Demnach bauten auch Pilze das ^{13}C des Phenols in ihre DNA ein. Ansätze nach 4 Tagen wiesen bereits ein spezifisches Bandenmuster in den schwereren Gradientenfraktionen auf, das in den Kontrollen nicht zu erkennen war (Abb. 55).

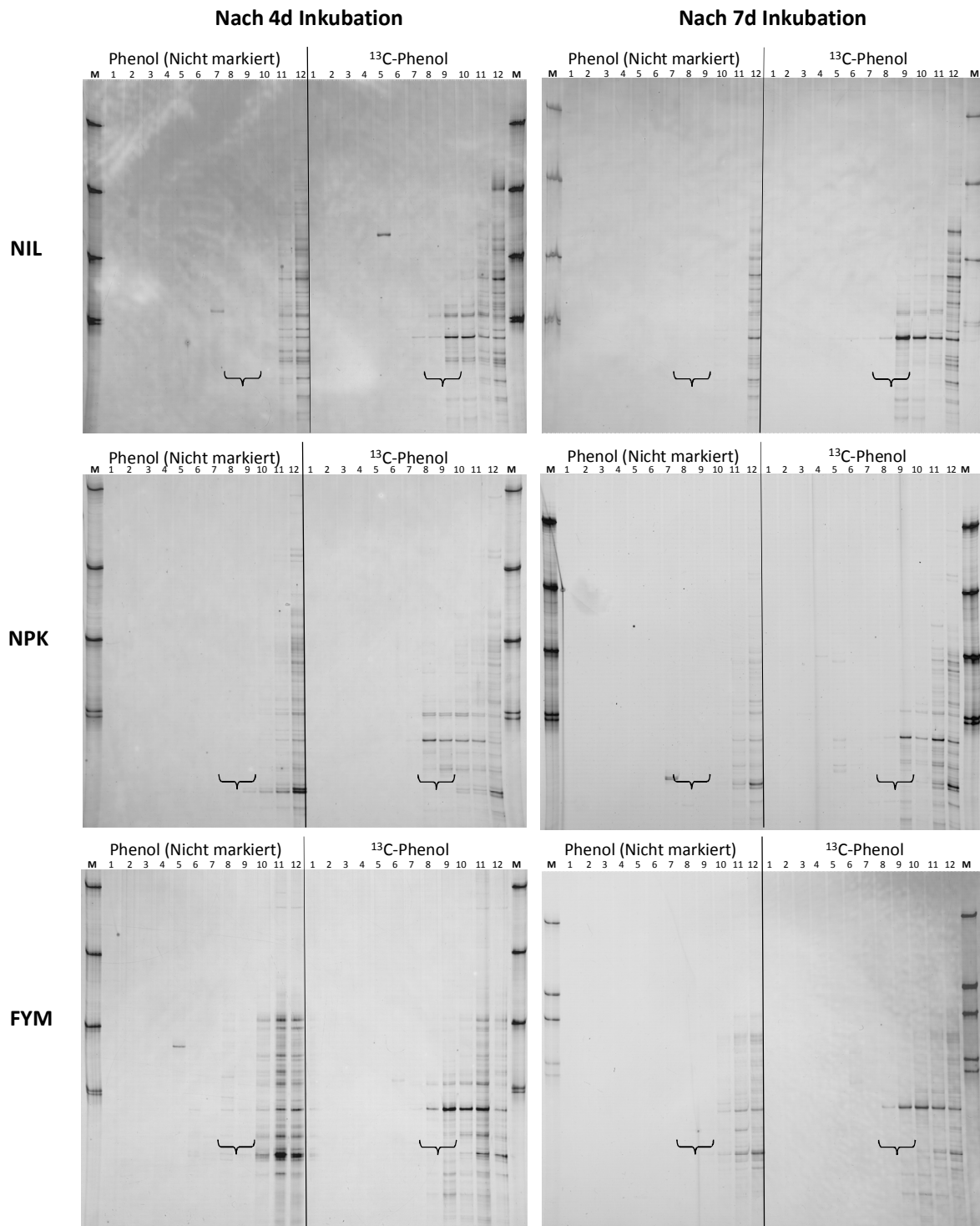


Abb. 55 SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU-ITS rRNA-Genen der *Fungi* aus DNA-Extrakten der Gradientenfractionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach 4 d und 7 d Inkubation mit nicht markiertem bzw. ¹³C-Phenol. Die Dichte der Gradientenfractionen (1 bis 12) nahm mit ansteigender Nummerierung ab. M=SSCP-Marker. Fractionen mit einer Dichte um 1,72 g ml⁻¹ wurden mit einer geschweiften Klammer markiert.

Die Banden der SSCP-Profile und deren jeweilige Intensitäten waren bei den unterschiedlichen Bodenvarianten jedoch gleich, d. h. die Vielfalt der am Phenol-Abbau beteiligten Pilze wurde nicht durch die damit verbundenen Unterschiede in den C_{org}-Gehalten beeinflusst. Die SSCP-Profile in den schweren Gradientenfractionen nach 4

und 7 Tagen waren sehr ähnlich (Abb. 56). In allen Fällen waren dabei eine dominante Bande sowie zwei bis drei weitere deutlich schwächere Banden zu erkennen.

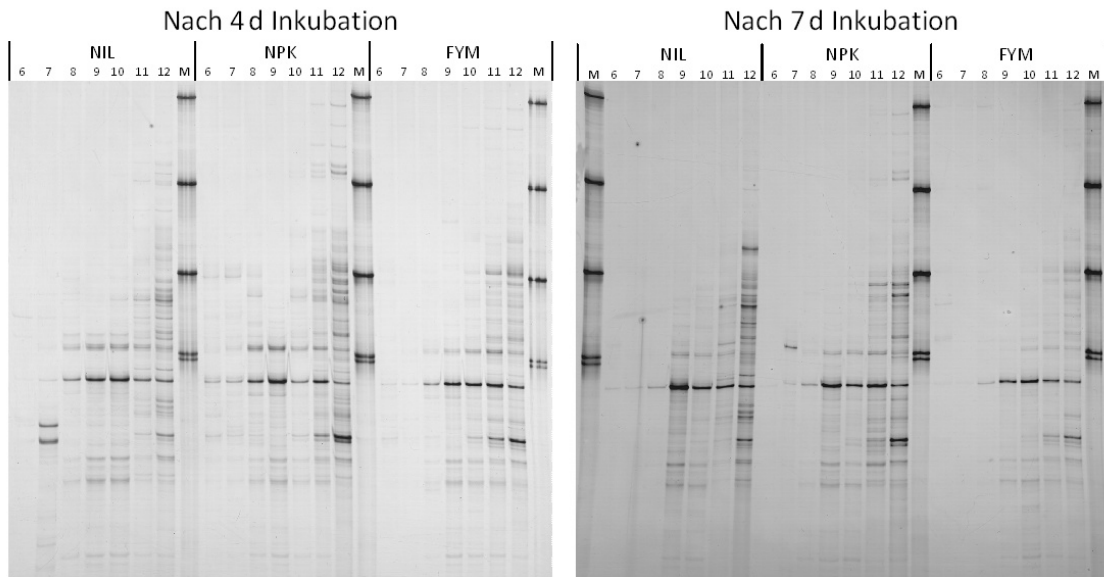


Abb. 56 SSCP-Profil von PCR-amplifizierten SSU-ITS rRNA-Genen der *Fungi* aus DNA-Extrakten der Gradientenfractionen nach 4 d und 7 d Inkubation mit ^{13}C -Phenol. Die Dichte der Gradientenfractionen (6 bis 12) nahm mit ansteigender Nummerierung ab. M=SSCP-Marker.

Um die am Phenol-Abbau beteiligten Pilze zu identifizieren, wurden die in Abbildung 57 markierten Banden kloniert und sequenziert.

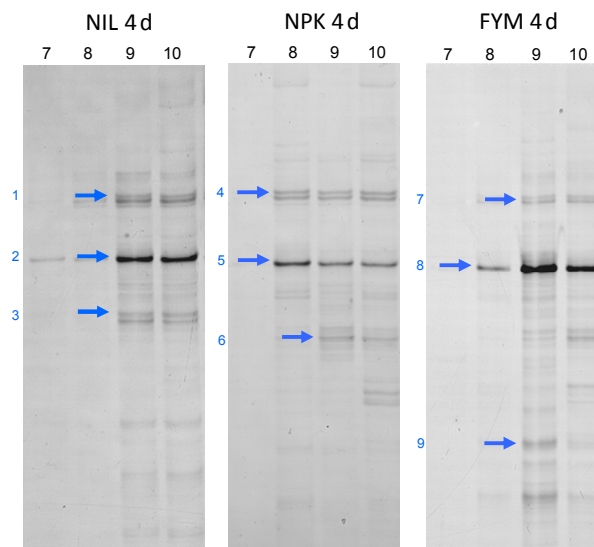


Abb. 57 Zur Sequenzierung ausgewählte Banden aus den *Fungi* SSCP-Profilen (^{13}C -Phenol).

Die phylogenetische Analyse der DNA-Sequenzen aus den dominanten Banden 2, 5 und 8 wiesen auf die Zugehörigkeit zu den *Basidiomycota* hin, wobei die höchste Ähnlichkeit zu Sequenzen aus bisher nicht kultivierten Vertretern bestand (Tab. 48). Der 18S rRNA-Genabschnitt zeigte jedoch mit 99% die höchste Übereinstimmung zu dem von unterschiedlichen *Cryptococcus*-Arten. Von diesen lagen in den verwendeten Datenbanken

jedoch keine Sequenzinformationen zum ITS/5.8S-Bereich vor. Die Sequenz der schwächeren oberen Bande, repräsentiert durch die Banden 1, 4 und 7, wies die höchste Übereinstimmung zu einem Vertreter der *Ascomycota* auf. Da diese mit maximal 87 % aber vergleichsweise gering ausfiel und die Unterschiede im ITS-Bereich der Sequenz lagen, war davon auszugehen, dass die DNA dieser Banden zwar von einem Ascomyceten, nicht aber von dieser Art abstammte. Weitere, nicht näher bezeichnete Banden aus den schweren Fraktionen (3, 9) wiesen Ähnlichkeiten zu Vertretern der *Ascomycota* auf (Tab. 48). Eine Analyse der Sequenzen mit Hilfe der ARB-SILVA Datenbank bestätigte die Ähnlichkeiten der Sequenzen zu Pilzen aus den entsprechenden Gruppen.

Tab. 48 Phylogenetische Zuordnung der SSU-ITS rRNA-Sequenzen der Banden von ^{13}C -Phenol *Fungi* SSCP-Profilen zu Einträgen der NCBI-Datenbank (BLAST-Analyse).

Bande	Länge der Partialsequenz	phylogenetische Einordnung	Nächster Verwandter in NCBI-Datenbank	Accession No.	% Ähnlichkeit
1,4,7	313	Ascomycota	<i>Mariannaea elegans</i>	AB111493	82 - 87
2,5,6,8	323	Basidiomycota	<i>Basidiomycete</i> sp.	AM901762*	95
3	305	<i>Fungi incertae sedis</i>	<i>Zygomycete</i> sp.	EU428773*	100
9	296	Ascomycota	<i>Ascomycete</i> sp.	DQ980574*	99

*= mehr als eine Übereinstimmung in der NCBI-Datenbank; ein repräsentatives Beispiel angegeben

Um die am Abbau des Phenols beteiligten Pilze genauer zu charakterisieren und in ihrer Quantität zu beurteilen, wurden analog zu den Untersuchungen der Bakterien Klon-Bibliotheken aus den schweren Gradientenfraktionen der drei Bodenvarianten aus der Inkubation nach 4 Tagen erstellt. Dafür wurde mit dem Primerpaar ITS1/ITS4r ein längerer Abschnitt der 18S-ITS1-5,8S rRNA-Gensequenz amplifiziert (2.5.11.2).

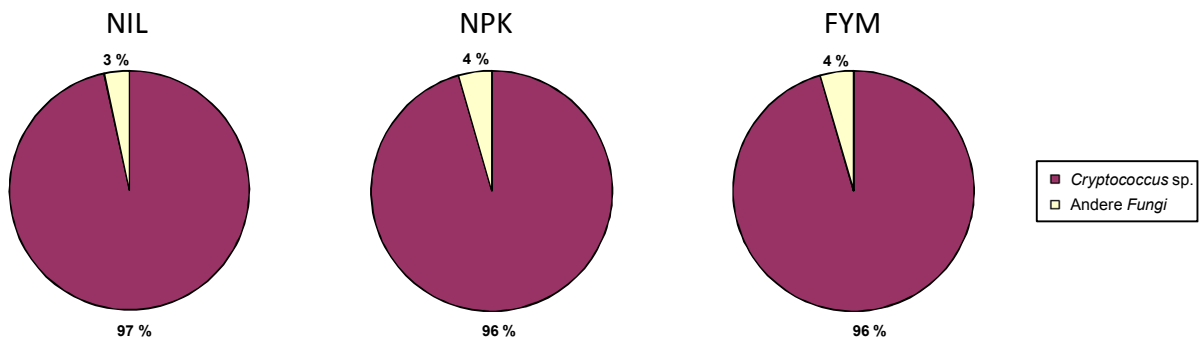


Abb. 58 Zusammensetzung der *Fungi*-Klon-Bibliotheken aus schweren Gradientenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach 4 d Inkubation mit ^{13}C -Phenol. Die Ergebnisse beruhen auf der Auswertung von 57 (NIL), 64 (NPK) bzw. 53 (FYM) Klonsequenzen.

Die *Fungi*-Klon-Bibliotheken (Abb. 58, Anhang Tab. 64-66) zeigten die deutliche Dominanz eines nah mit *Cryptococcus* sp. (*Basidiomycota*) verwandten Pilzes in den schweren Gradientenfraktionen. Unabhängig von der Bodenvariante waren $\geq 96\%$ der erhaltenen Sequenzen mit diesem identisch. Dies bestätigte die Ergebnisse der SSCP Analyse, bei der die intensivste Bande einem Vertreter der *Basidiomycota* zuzuordnen war. Im Versuchsboden schienen somit in erster Linie Vertreter aus dieser Gruppe am Phenol-Abbau beteiligt zu sein. Die mit den unterschiedlichen Primerpaaren erhaltenen Sequenzen

überlappten sich in einem Bereich von 207 Basenpaaren. Da die Sequenz aus der Klon-Bibliothek in diesem Abschnitt eine 99 % Übereinstimmung mit der Sequenz aus der intensivsten Bande zeigte, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um den gleichen Basidiomyceten handeln könnte, der bereits in SSCP-Profilen zu sehen war.

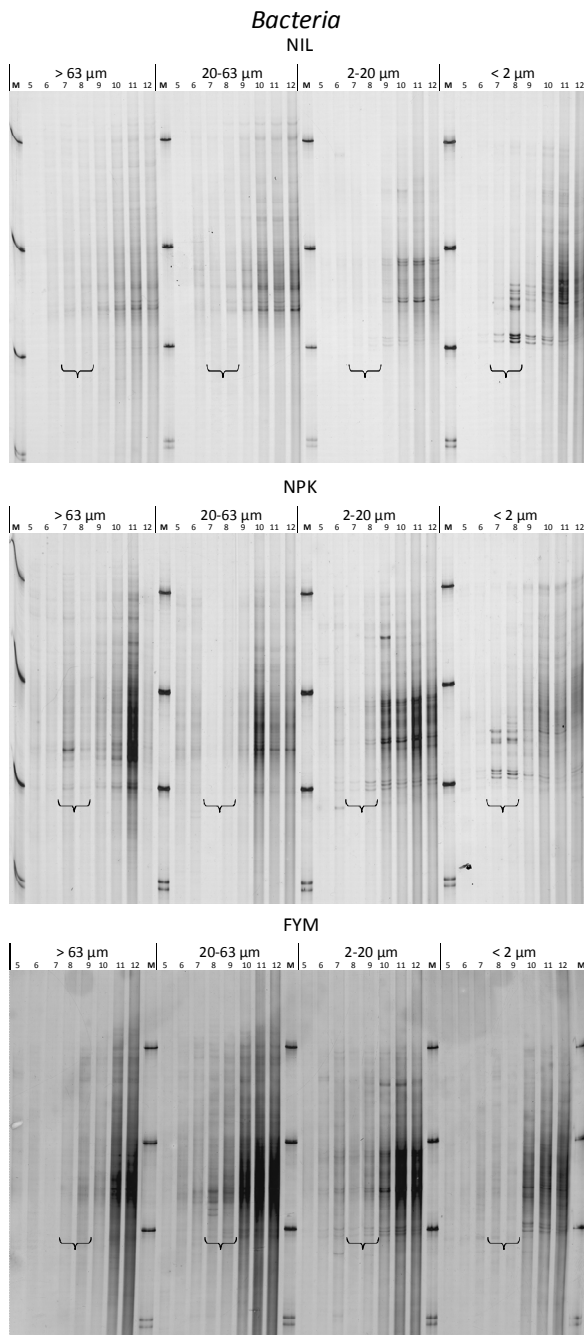
Räumliche Verteilung der Phenol-Abbauer im Boden

Um die räumliche Verteilung der am Abbau beteiligten Mikroorganismen-Gemeinschaften zu betrachten, wurde eine Korngrößenfraktionierung des 4 Tage mit ^{13}C -Phenol inkubiertem Bodens durchgeführt. Dafür wurden 10 g Boden (Trockengewicht) einer Mischprobe aus den drei Parallelen des Inkubationsversuchs, wie in Material und Methoden unter 2.5.1 beschrieben, in einer Fraktionierung eingesetzt. Aus den Fraktionen wurde die DNA extrahiert, in SIP-Dichtegradienten zentrifugiert und aufgearbeitet. Die Erstellung der Profile erfolgte über PCR-SSCP (2.5.8).

Die *Bacteria*-Profile von NIL und NPK zeigten, dass die am Abbau beteiligten Bakterien in den feineren Fraktionen lokalisiert waren (Abb. 59 A). So war bei diesen Bodenvarianten das charakteristische Bandenmuster der Abbauer nur in den schweren Gradientenfraktionen der Feinschluff und Tonfraktion ($< 20\ \mu\text{m}$ bis $< 2\ \mu\text{m}$) zu erkennen. Die Intensität der Banden war in der $< 2\ \mu\text{m}$ Fraktion allerdings deutlich stärker und bei der 2-20 μm Fraktion nur schwach ausgeprägt. Bei der FYM-Variante war das charakteristische Muster dagegen in der 20-63 μm Fraktion und schwächer bei der 2-20 μm Fraktion zu erkennen. Da es eher unwahrscheinlich ist, dass die identischen Abbauer bei dieser Variante in einer anderen Fraktion wieder zu finden sind, könnte hier ein Fehler bei der Aufarbeitung der SIP-Gradientenfraktionen bzw. eine Vertauschung der Proben zu einem abweichenden Ergebnis geführt haben.

Auch bei den *Fungi* trat in den Fraktionen das für die Phenol-Abbauer typische Bandenmuster aus den Profilen des nicht-fraktionierten Bodens auf (Abb. 59 B). Dieses lag unabhängig von der Bodenvariante im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den *Bacteria* nur in den „schweren“ Gradientenfraktionen des Feinschluffs (2-20 μm) vor, was für eine Assoziation der Phenol-abbauenden Pilze mit dieser Fraktion spricht.

A



B

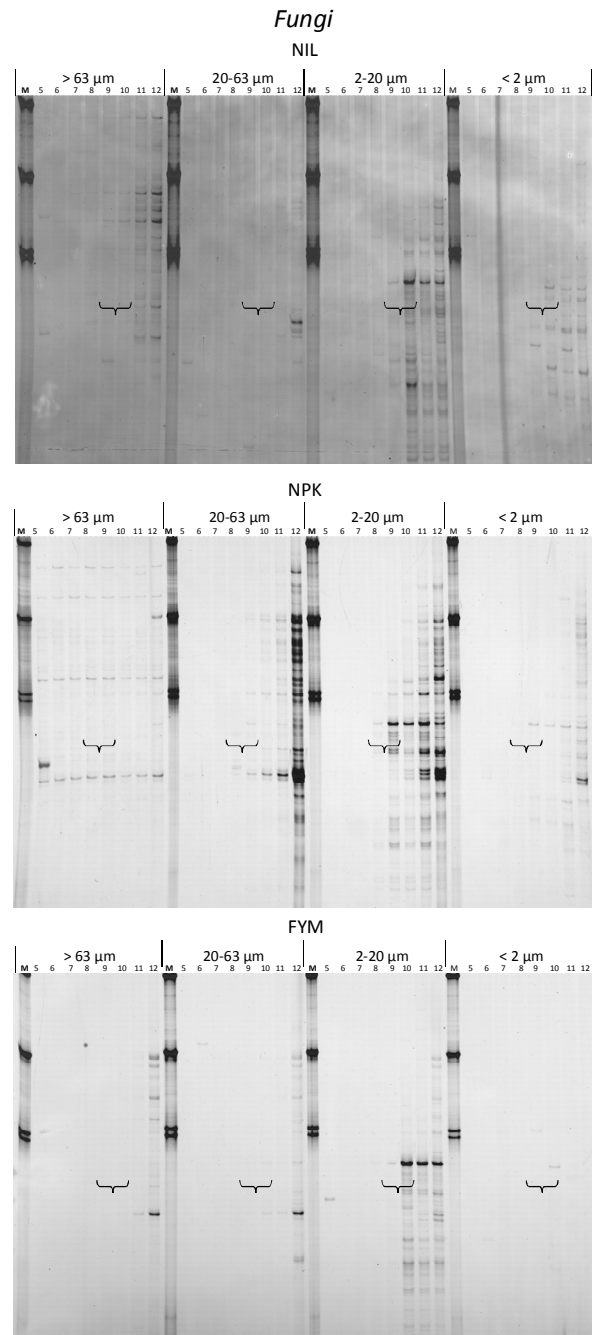


Abb. 59 SSCP-Profil von PCR-amplifizierten SSU bzw. SSU-ITS rRNA-Genen der *Bacteria* und *Fungi* aus DNA-Extrakten der Gradientenfractionen von Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM nach 4 d Inkubation mit ^{13}C -Phenol. Die Dichte der Gradientenfractionen (5 bis 12) nahm mit ansteigender Nummerierung ab. M=SSCP-Marker. Fractionen mit einer Dichte um $1,72 \text{ g ml}^{-1}$ wurden mit einer geschweiften Klammer markiert.

2,4-DCP-Abbau durch Bacteria

Ein Einbau des ^{13}C aus 2,4-DCP in die DNA war bei der NPK-Variante nach 9-tägiger Bodeninkubation erkennbar. Im Gegensatz dazu waren bei der FYM-Variante zu diesem Zeitpunkt noch keine spezifischen Banden in den schweren Gradientenfractionen nachweisbar. Dies korreliert mit den Abbauraten der Verbindung (vgl. Abschnitt 3.4.2). So traten nach 21 Tagen Inkubation auch bei der FYM-Variante charakteristische Banden in den

SSCP-Profilen auf. Die Kontrollen mit der nicht markierten Verbindung wiesen weder nach 9 noch nach 21 Tagen Banden in diesen schwereren Fraktionen auf (Abb. 60).

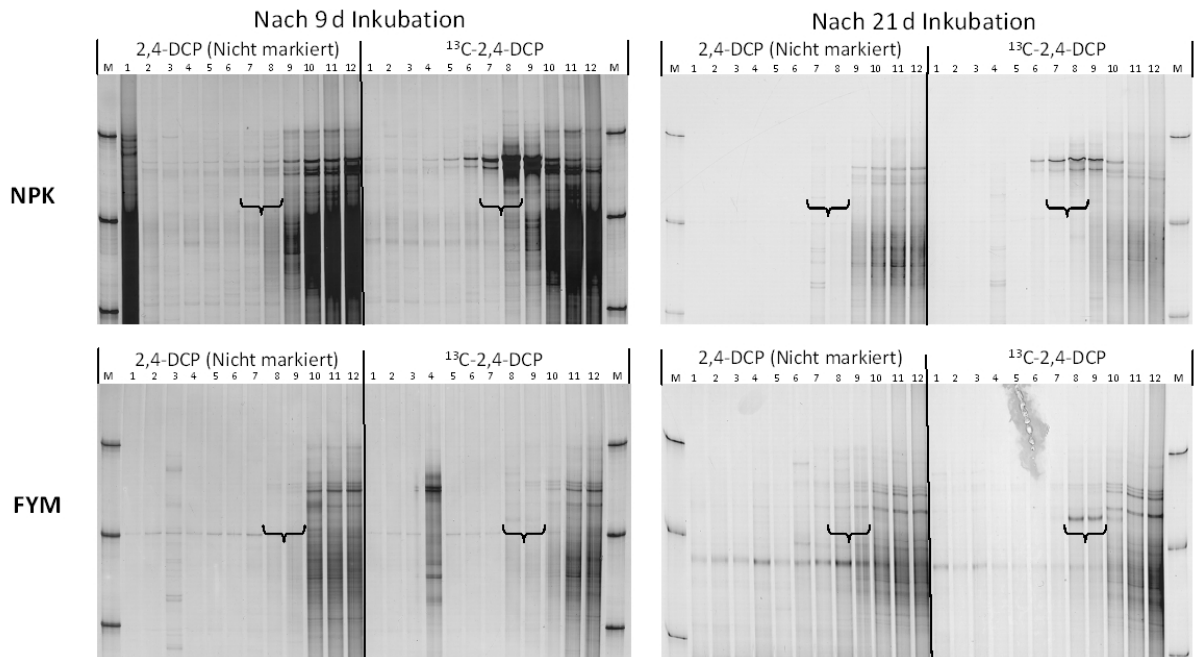


Abb. 60 SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der *Bacteria* aus DNA-Extrakten der Gradientenfraktionen der Bodenvarianten NPK und FYM nach 9 d und 21 d Inkubation mit nicht markiertem bzw. ¹³C-2,4-DCP. Die Dichte der Gradientenfraktionen (1 bis 12) nahm mit ansteigender Nummerierung ab. M=SSCP-Marker. Fraktionen mit einer Dichte um 1,72 g ml⁻¹ wurden mit einer geschweiften Klammer markiert.

Die Banden der SSCP-Profile aus den beiden Bodenvarianten NPK und FYM in den schweren Fraktionen waren deutlich unterschiedlich (Abb. 61). Während bei der NPK-Variante zwei SSCP-Banden unterhalb der obersten Marker-Bande zu erkennen waren, lag bei der FYM-Variante nur eine einzelne Bande oberhalb der zweiten Marker-Bande vor. Offensichtlich waren bei den Bodenvarianten unterschiedliche Bakterien am Abbau des 2,4-DCP beteiligt.

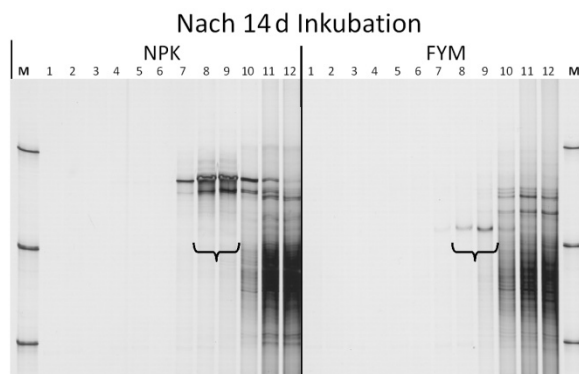


Abb. 61 SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der *Bacteria* aus DNA-Extrakten der SIP-Gradientenfraktionen der Bodenvarianten NPK und FYM nach 14 d Inkubation mit ¹³C-2,4-DCP. Die Dichte der Gradientenfraktionen (1 bis 12) nahm mit ansteigender Nummerierung ab. M=SSCP-Marker. Fraktionen mit einer Dichte um 1,72 g ml⁻¹ wurden mit einer geschweiften Klammer markiert.

Im weiteren Verlauf der Bodeninkubation trat, wie schon bei Phenol beobachtet, keine Veränderung der SSCP-Banden auf. Die Zahl der Banden und deren Position in den ^{13}C -Profilen blieben unverändert (Abb. 62). Die intensivere Färbung der Bande nach 21 Tagen bei der SSCP-Bande bei der FYM-Variante wies auf eine Anreicherung eines 2,4-DCP-abbauenden Bakteriums zwischen der zweiten und dritten Woche hin.

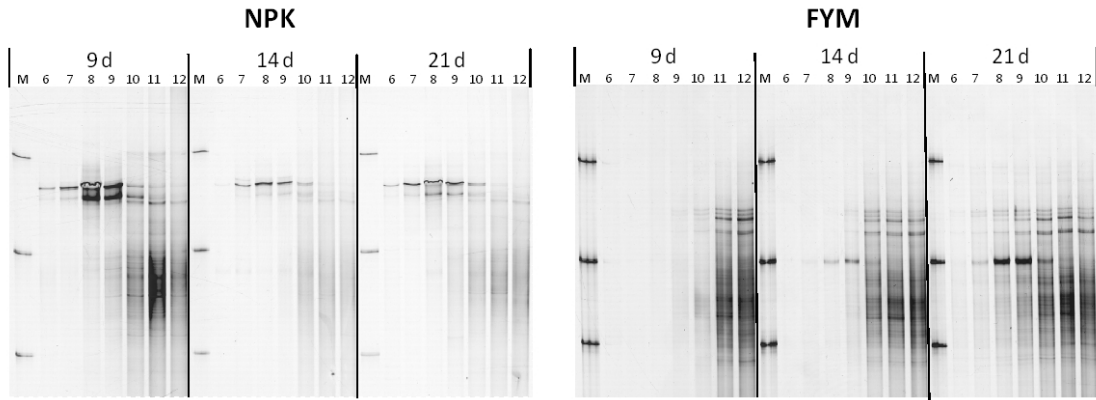


Abb. 62 SSCP-Profile von PCR-amplifizierten SSU rRNA-Genen der *Bacteria* aus DNA-Extrakten der Gradientenfractionen der Bodenvarianten NPK und FYM zur Darstellung des Zeitverlauf des ^{13}C -Einbaus in die DNA bei der NPK und der FYM-Variante nach 9 d, 14 d und 21 d Inkubation mit ^{13}C -2,4-DCP. Die Dichte der Gradientenfractionen (6 bis 12) nahm mit ansteigender Nummerierung ab. M=SSCP-Marker.

Um die Organismen zu identifizieren, die am Abbau von 2,4-DCP beteiligt waren, wurde, wie zuvor für den Phenol-Abbau beschrieben, die DNA aus den Banden der schweren Profile ausgewählt, die SSU rRNA-Gene mit PCR amplifiziert, kloniert, sequenziert und phylogenetisch untersucht (Abb. 63).

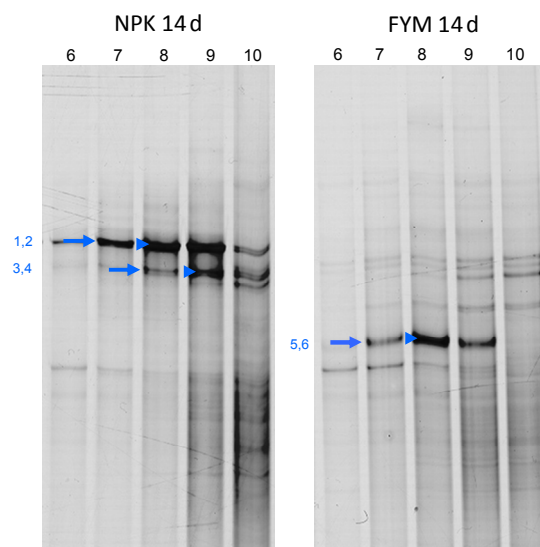


Abb. 63 Zur Sequenzierung ausgewählte Banden aus den *Bacteria* SSCP-Profilen (^{13}C -2,4-DCP).

Die phylogenetischen Analysen zeigten, dass in beiden Bodenvarianten Bakterien aus der Gruppe der Betaproteobacteria den wesentlichen Anteil am Abbau von 2,4-DCP hatten. Die

Banden der NPK-Variante wiesen hohe Sequenzähnlichkeiten zu *Burkholderia* sp. auf, während die Bande der FYM-Variante *Variovorax* sp. zugeordnet werden konnte (Tab. 49).

Tab. 49 Phylogenetische Zuordnung der SSU rRNA-Sequenzen der Banden von *Bacteria* SSCP-Profilen (^{13}C -2,4-DCP) zu Einträgen der NCBI-Datenbank (BLAST-Analyse).

Bande	Länge der Partialsequenz	phylogenetische Einordnung	Nächster Verwandter in NCBI-Datenbank	Accession No.	% Ähnlichkeit
1,2	369	Betaproteobacteria	<i>Burkholderia</i> sp.*	EU827482*	100
3,4	354 bzw. 369	Betaproteobacteria	<i>Burkholderia</i> sp.*	EF073473*	99 - 100
5,6	369	Betaproteobacteria	<i>Variovorax</i> sp.*	AF538929*	100

*= mehr als eine Übereinstimmung in der NCBI-Datenbank, daher ein repräsentatives Beispiel angegeben

Zur weiteren Analyse wurden die ermittelten Sequenzen mit einigen verwandten Arten aus der ARB-Datenbank (Version Januar 2005) verglichen. Hierfür wurde ein phylogenetischer Baum berechnet, mit dem die Zuordnung zu den Gattungen *Burkholderia* bzw. *Variovorax* bestätigt werden konnte (Abb. 64). Eine genauere Klassifizierung war aufgrund hoher Ähnlichkeiten der SSU rRNA-Basensequenz innerhalb der Arten jedoch nicht möglich.

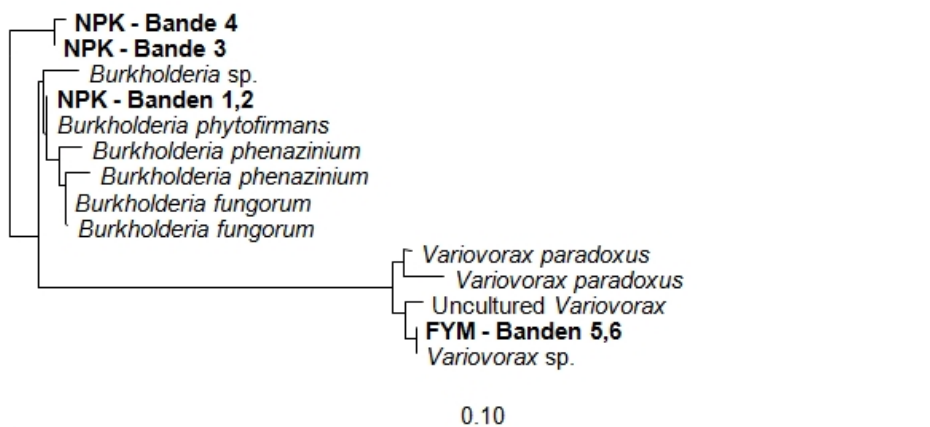


Abb. 64 Phylogenetischer Baum (Maximum likelihood) mit den Klon-Sequenzen aus den schweren Fraktionen des 2,4-DCP *Bacteria* SSCP-Gels (vgl. Abb. 63, Tab. 49) und Sequenzen aus der ARB-Datenbank. Der Baum wurde mit der ARB-Software berechnet (vgl. 2.5.11.3). Der Größenbalken gibt die evolutionäre Distanz an.

2,4-DCP-Abbau durch *Fungi*

Bei den *Fungi* konnte keine Anreicherung von ^{13}C in schweren Fraktionen festgestellt werden (keine Abbildung). Offensichtlich waren die Bodenpilze, im Gegensatz zum Phenol-Abbau, nicht am Abbau des 2,4-DCP beteiligt.

4. Diskussion

4.1 Methodische Aspekte: Fraktionierung

Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Mikroorganismen für Abbauprozesse von organischen Schadstoffen in Böden besser zu verstehen und dabei besonders den Einfluss der organischen Bodensubstanz zu berücksichtigen. Böden sind jedoch nicht homogen aufgebaut, sondern enthalten unterschiedliche Kompartimente (Mikrohabitate), die sowohl mit den organischen Stoffen als auch den Mikroorganismen in verschiedenartige Wechselwirkungen treten können. Um verschiedene Mikrokompartimente zu gewinnen, wurden daher die Böden nach ihren Korngrößenfraktionen, d. h. in Sand, Schluff und Ton aufgetrennt. Klassische Verfahren der Bodenkunde zur Bestimmung der Anteile von Korngrößenfraktionen eines Bodens sind Pipett- und Aräometer-Methoden, die auf Sedimentationsanalysen beruhen (Blume *et al.* 2010). Diese Verfahren waren für die Untersuchungen in dieser Arbeit jedoch ungeeignet, da sie es nicht erlauben, die Korngrößenfraktionen getrennt voneinander zu sammeln und weiter zu untersuchen. Für biologische Untersuchungen an Bodenfraktionen wurden deshalb in früheren Untersuchungen Verfahren eingesetzt, die auf der Dispergierung der Bodenaggregate durch Ultraschall in einer Boden-Wasser Lösung beruhen (Oades & Waters 1991, Cambardella & Elliott 1994, Amelung *et al.* 1998, Roscoe *et al.* 2000). Eine derartige Methode, die für Untersuchungen zur heterogenen Verteilung von organischem Kohlenstoff (C_{org}) entwickelt wurde und neben der Ultraschallbehandlung Feuchtsiebe-, Zentrifugations- und Sedimentationsschritte beinhaltet, eignete sich auch für den gewählten Versuchsboden (Vogt 2004).

Die Ultraschallbehandlung birgt jedoch das Risiko, dass intakte Zellen von Bodenmikroorganismen bei der Fraktionierung zerstört bzw. von den assoziierten Partikeln abgelöst werden. Beides sollte für die Untersuchungen in dieser Arbeit so weit wie möglich verhindert werden, da die spezifische Verbindung von Partikelfractionen und mikrobiellen Zellen die Grundlage für die weiteren Untersuchungen liefern sollte. Daher wurde der Energieeintrag über Ultraschall um 96 % im Vergleich zur Methode von Amelung *et al.* (1998) durch Verringerung der Beschallungsdauer im ersten Behandlungsschritt und den vollständigen Verzicht auf einen zweiten Beschallungsschritt reduziert. Als Folge ergab sich, dass der ermittelte Tongehalt ($< 2 \mu m$) der Böden im Vergleich zur Verwendung des ursprünglichen Protokolls abnahm. Diese Veränderung war jedoch so gering, dass die ermittelten Anteile der Korngrößenfraktionen weiterhin im Bereich der publizierten Werte für diesen Boden lagen (Körschens & Pfefferkorn 1998, Kahle *et al.* 2002, Vogt 2004).

Die Wiederauffindungsraten der DNA und des Biomasse-C im Boden waren nach der Ultraschallbehandlung mit dem modifizierten Protokoll fast doppelt so hoch wie bei Verwendung der Beschallungszeiten nach Amelung *et al.* (1998). Die wiedergefundenen Mengen entsprachen dabei annähernd denen des unbehandelten Bodens, was zeigte, dass ein

Großteil der mikrobiellen Zellen bei der reduzierten Ultraschallbehandlung im Gegensatz zu der von Amelung *et al.* empfohlenen Ultraschallbehandlung erhalten blieb. Die weiteren Schritte der Korngrößenfraktionierung (Nasssiebung, Zentrifugation, Sedimentation) führten zu Verlusten von maximal 2 % durch Ablösen der mikrobiellen Biomasse. Dieses ließ sich sowohl durch die Ermittlung der DNA-Gehalte als auch durch den qPCR Nachweis der bakteriellen SSU rRNA-Genkopienzahlen im Waschwasser am Ende der Aufarbeitung beispielhaft bei den Varianten NIL und FYM nachweisen (vgl. Tab. 36). Der nahezu vollständige Erhalt der Mikroorganismen nach der Korngrößenfraktionierung wurde auch durch die DNA-Gehalte und SSU rRNA-Genkopienzahlen in den vier gewonnenen Fraktionen bestätigt. Die Summe der DNA-Gehalte in den Fraktionen entsprach unter Berücksichtigung ihrer prozentualen Verteilung bei allen drei Bodenvarianten denen der nicht-fraktionierten Böden (vgl. Abb. 18). Die Anzahl der SSU rRNA-Gen-Kopien in den Fraktionen stimmte für die Bakterien, Archaeen und Pilze ebenfalls mit denen des nicht-fraktionierten Boden überein bzw. lag bei den Bakterien sogar etwas über diesen Werten (Abb. 65). Dies kann auf eine etwas effizientere Extraktion der Nukleinsäuren von den isolierten Partikelfraktionen im Vergleich zur Extraktion aus nicht-fraktioniertem Boden zurückgeführt werden.

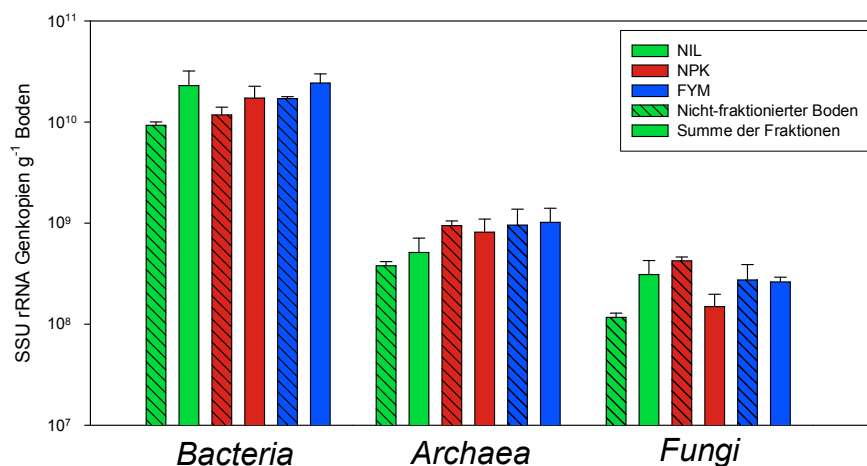


Abb. 65 Vergleich der SSU rRNA-Genkopienzahlen des nicht-fraktionierten Bodens und ihrer Summe in den Fraktionen unter Berücksichtigung der Korngrößenverteilung (n=3) der drei Bodenvarianten NIL, NPK und FYM (Originaldaten aus Abb. 24 und Abb. 25 dieser Arbeit).

Die mit dem in dieser Arbeit modifizierten Protokoll erhaltenen Korngrößenfraktionen zeigten charakteristische Eigenschaften im Hinblick auf ihre spezifischen Oberflächen und C_{org}-Gehalte, wie in parallelen Untersuchungen von Köhler ermittelt wurde (Tab. 50, Tab. 51) (Köhler 2010).

Tab. 50 Spezifische Oberfläche der Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM (n=3) (Köhler 2010). Kleine hochgestellte Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Bodenvarianten.

Bodenvariante	Spezifische Oberfläche (m ² g ⁻¹ Fraktion)			
	> 63 µm	20-63 µm	2-20 µm	< 2 µm
NIL	6,7 ± 0,4 ^a	7,2 ± 0,4 ^a	49,4 ± 2,5 ^a	220,4 ± 5,0 ^a
NPK	4,4 ± 0,3 ^b	7,7 ± 0,5 ^a	44,9 ± 1,9 ^b	256,2 ± 1,6 ^b
FYM	12,2 ± 0,6 ^c	10,1 ± 0,9 ^b	42,2 ± 1,0 ^b	239,8 ± 3,3 ^c

Tab. 51 Organische Kohlenstoffgehalte der Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM (n=3) (Köhler 2010). In Klammern ist der prozentuale Anteil am in den Fraktionen wiedergefundenen C_{org} angegeben; kleine hochgestellte Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Bodenvarianten.

Bodenvariante	C_{org} (g C g ⁻¹ Fraktion)			
	> 63 μ m	20-63 μ m	2-20 μ m	< 2 μ m
NIL	9,2 \pm 1,1 ^a (3 %)	4,0 \pm 0,2 ^a (9 %)	14,6 \pm 0,3 ^a (28 %)	43,4 \pm 1,6 ^a (60 %)
NPK	14,6 \pm 0,6 ^b (5 %)	3,4 \pm 0,1 ^b (8 %)	15,9 \pm 0,9 ^b (30 %)	44,5 \pm 0,9 ^a (58 %)
FYM	38,1 \pm 4,7 ^c (10 %)	11,1 \pm 0,5 ^c (18 %)	18,8 \pm 1,3 ^c (26 %)	46,8 \pm 3,1 ^a (46 %)

Die Daten zeigten, dass die Oberflächen und die C_{org} -Gehalte der Fraktionen < 63 μ m bei allen Bodenvarianten negativ mit der Korngröße korrelierten, was auf eine unterschiedliche Zusammensetzung dieser Fraktionen mit jeweils charakteristischen Eigenschaften hindeutete. Die spezifischen Oberflächen der einzelnen Fraktionen < 63 μ m lagen dabei unabhängig von der Bodenvariante in einem ähnlichen Größenbereich (Tab. 50). Dies bestätigte, dass durch die Fraktionierung Bodenfraktionen mit vergleichbaren und typischen Partikelgrößen erzeugt wurden. Erwartungsgemäß nahm die Oberfläche dabei mit der angenommenen Korngröße ab und war demnach in der Tonfraktion (< 2 μ m) am höchsten. Die spezifische Oberfläche der > 63 μ m Fraktion lag dagegen in einem ähnlichen Bereich wie die der 20-63 μ m Fraktion. Auch unterschied sich die Oberfläche dieser Fraktion zwischen den Bodenvarianten stärker als die der anderen Fraktionen, was auf die im Vergleich heterogenere Struktur dieser Fraktion mit Partikelgrößen von 63 bis 2000 μ m zurückzuführen war. Der Großteil des organischen Kohlenstoffs befand sich an der Tonfraktion, die mit 46 bis 60 % gleichzeitig dem höchsten prozentualen Anteil am in den Fraktionen wiedergefundenen Gesamt- C_{org} entsprach (Tab. 51). Dies stimmte mit vorhergehenden Untersuchungen des C_{org} an Korngrößenfraktionen des Versuchsbodens überein, bei denen für diese Fraktion mit 58 bis 68 % ähnliche Werte ermittelt wurden (Leinweber *et al.* 1994, Kahle *et al.* 2002, Vogt 2004).

Die unterschiedliche Verteilung der organischen Substanz auf die Fraktionen und ihre starke Anreicherung in der Tonfraktion ist durch die physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser Fraktion und den unterschiedlichen Degradationsgrad des organischen Materials zu erklären. So liegt an den größeren Partikeln (> 63 μ m) noch wenig verändertes pflanzliches Ausgangsmaterial vor, das mit relativ hohen Abbauraten von vielen Mikroorganismen als Substrat genutzt werden kann. Das zunehmend prozessierte Material gelangt nach und nach in Bodenkompimente mit kleineren Partikelgrößen (< 63 μ m). Das am stärksten degradierte Material, dass nur noch langsam von Mikroorganismen verwertet werden kann, reichert sich schließlich an den feinsten Fraktionen, d. h. dem Feinschluff (2-20 μ m) und vor allem dem Ton (< 2 μ m) an (Chafetz *et al.* 2002). Die hohe Affinität des C_{org} an Tonpartikel zu binden beruht auf starken Wechselwirkungen, die diese mit den Tonmineralen bzw. Metalloxiden eingehen können, wodurch stabile organo-mineralische Komplexe ausgebildet werden (vgl. Abb. 1). Die ähnlich hohe prozentuale Verteilung des C_{org} auf die beiden feineren Fraktionen (2-20 μ m, < 2 μ m) bei allen Bodenvarianten wies darauf hin, dass diese Strukturen während der Fraktionierung weitgehend erhalten blieben und keine

Umverteilung des organischen Kohlenstoffs während des Fraktionierungsverfahrens erfolgte.

Die Analysewerte zeigten, dass die Langzeitdüngung keinen signifikanten Einfluss auf die C_{org} -Gehalte an den Tonfraktionen hatte (Tab. 51). Dies könnte daran liegen, dass die Aufnahmekapazität der Tonpartikel für den organischen Kohlenstoff bereits bei der Variante NIL gesättigt war und bei NPK und FYM trotz der höheren zur Verfügung stehenden Kohlenstoffmenge in Form von Pflanzenmaterial bzw. organischem Dünger keine weitere Anlagerung mehr möglich war – ein Phänomen, das bereits in anderen Untersuchungen beobachtet wurde (Christensen 2001). Die gleichen C_{org} -Gehalte in den Tonfraktionen der drei Varianten zeigten auch, dass mit dem hier modifizierten Fraktionierungsprotokoll aus den Bodenvarianten trotz des unterschiedlichen Düngungsgrads vergleichbare Bodenfraktionen gewonnen werden konnten. In den drei Fraktionen $> 2 \mu\text{m}$ führten die verschiedenen Langzeitdüngungen dagegen zu unterschiedlichen Mengen an C_{org} , wobei ein Anstieg von NIL über NPK zu FYM zu verzeichnen war (Tab. 51). Dies stimmte mit den Ergebnissen für die nicht-fraktionierten Böden überein (vgl. Tab. 30). Während die C_{org} -Gehalte in den Bodenvarianten der beiden Schlufffraktionen trotz signifikanter Unterschiede jeweils nah beieinander lagen, stieg der Gehalt in der $> 63 \mu\text{m}$ Fraktion von der NIL- zur NPK-Variante um etwa das Doppelte an. Der C_{org} -Gehalt der FYM-Variante war sogar viermal so hoch wie jener der NIL-Variante. Dieser starke Anstieg lässt sich mit pflanzlichen Rückständen im Boden, die nach dem ersten Siebschritt bei der Fraktionierung in die $> 63 \mu\text{m}$ Fraktion gelangten, erklären. Untersuchungen, bei denen durch Floating die organischen Partikel von den tatsächlichen Sandpartikeln getrennt werden, z. B. mit Hilfe von Schwerflüssigkeiten („high density solutions“) (Meijboom *et al.* 1995, Crow *et al.* 2007), könnten hierüber in Zukunft Aufschluss geben. Da die Düngung zu einem höheren Pflanzenertrag führt, erhöhte sich die Menge der pflanzlichen Rückstände in den gedüngten Varianten. Aufgrund dieser Rückstände war die in dieser Arbeit gewonnene $> 63 \mu\text{m}$ Fraktion daher nicht als eine „echte“ Sandfraktion anzusehen. Neben der höheren Menge an Pflanzenmaterial trugen bei der Bodenvariante FYM vermutlich auch die Überreste aus der organischen Düngung mit Stallmist zu einer Erhöhung der C_{org} -Gehalte in den Fraktionen bei.

Deutliche Unterschiede bei der Sorption von Phenol und 2,4-DCP an die vier verschiedenen Partikelfraktionen stützten die Annahme, dass durch die Fraktionierung charakteristische Korngrößenklassen gewonnen wurden. So lagen an der $> 63 \mu\text{m}$ und der Tonfraktion bei unterschiedlichen Schadstoffkonzentrationen und unabhängig von der Bodenvariante jeweils höhere Phenol und 2,4-DCP-Gehalte vor als an den Schlufffraktionen (vgl. Abb. 42, Abb. 44). Die Unterschiede zwischen den an die Fraktionen sorbierten Mengen konnten auf die unterschiedlichen C_{org} -Gehalte und Oberflächen der Bodenpartikel in den Fraktionen zurückgeführt werden (Tab. 52). Die Korrelation nahm dabei von NIL über NPK zu FYM ab, was vermutlich auf Sorption mit den erhöhten wenig degradierten pflanzlichen Rückständen in der „Sand“-Fraktion ($> 63 \mu\text{m}$) zusammenhing.

Tab. 52 Korrelationskoeffizienten (R^2) der Beziehung zwischen den sorbierten Schadstoffmengen ($\mu\text{g g}^{-1}$ Boden) und dem C_{org} -Gehalt (mg g^{-1} Boden) bzw. der spezifischen Oberfläche ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ Boden) der Korngrößenfraktionen bei den Schadstoff-Konzentrationen 0,1 und 10 mM.

Korrelation mit:		NIL		NPK		FYM	
		0,1 mM	10 mM	0,1 mM	10 mM	0,1 mM	10 mM
C_{org}	Phenol	0,98	0,99	0,99	0,92	0,98	0,94
	2,4-DCP	0,96	0,90	0,85	0,75	0,51	0,14
Oberfläche	Phenol	1,0	1,0	0,91	0,77	0,99	0,83
	2,4-DCP	0,98	0,99	0,95	0,91	0,72	0,33

Für die hier angestrebten mikrobiologischen Untersuchungen war es von entscheidender Bedeutung, dass die Mikroorganismen-Zellen durch den Fraktionierungs-Prozess nicht von ihren jeweiligen Partikeln, mit denen sie im nicht-fraktionierten Boden assoziiert waren, abgetrennt wurden. Das hier angewandte Fraktionierungs-Protokoll birgt eindeutig das Risiko einer Kreuzkontamination zwischen den Fraktionen, da sowohl die Beschallung als auch die Wasch- und Sedimentationsschritte zu einer Ablösung und Umverteilung der Mikroorganismen über die Wasserphase führen könnten. Die niedrigen DNA-Gehalte und SSU rRNA-Genkopienzahlen im Waschwasser (vgl. Tab. 36) deuteten jedoch darauf hin, dass sich bei der Aufarbeitung nur relativ wenige Mikroorganismen von den Partikeln ablösten. Möglicherweise könnten sich die Mikroorganismen aber sofort nach ihrer Ablösung an andere Partikelgrößen angelagert haben, so dass es zu einer Umlagerung kommen könnte. Dies müsste jedoch zu einer etwa gleichen mikrobiellen Vielfalt an den verschiedenen Partikelgrößen-Fraktionen führen. Gegen eine derartige Umverteilung sprechen jedoch eindeutig die mit der T-RFLP-Technik erstellten genetischen Profile, mit denen die Diversität der dominanten Bakterien, Archaeen und Pilze in den unterschiedlichen Korngrößenfraktionen erfasst wurde. Alle drei Mikroorganismen-Gruppen wiesen charakteristische Unterschiede zwischen den Profilen der Korngrößenfraktionen und daher in ihrer Diversität auf, die sowohl qualitativer (Vorliegen spezifischer Peaks und somit Mikroorganismen) als auch quantitativer Natur (höhere Abundanz von bestimmten Peaks) waren. Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Fraktionen wurden auch durch Ähnlichkeitsanalysen der Profile quantitativ bestätigt. Beim Vorliegen der gleichen Gemeinschaften in den Fraktionen wären dagegen identische Profile und keine Unterschiede bei der nachfolgenden Analyse zu erwarten gewesen.

Aufgrund der höheren Affinität von Mikroorganismen zur Bindung an kleinere Partikel wäre statt einer vollständigen Umverteilung der mikrobiellen Biomasse während der Fraktionierung jedoch auch eine bevorzugte Anreicherung an feineren Partikelfraktionen denkbar. Bei der Gewinnung der Tonfraktion erfolgte zudem eine Flokkulation der Partikel durch die Zugabe von MgCl_2 zum Waschwasser, wodurch abgelöste Mikroorganismen vor allem in diese Fraktion verschleppt worden sein könnten. Tatsächlich wurden die höchsten DNA-Gehalte sowie die höchste mikrobielle Besiedlung (über qPCR) in dieser Arbeit für die Tonfraktion ermittelt. Dies bestätigt viele frühere Untersuchungen, die zeigten, dass der Großteil der Mikroorganismen in Böden mit den feineren Fraktionen, insbesondere dem Feinschluff und Ton, assoziiert ist (Hattori 1988, Christensen 1992, Ranjard & Richaume

2001). Gegen eine Verschleppung von Mikroorganismen spricht auch die unterschiedliche Diversität der Mikroorganismen an den Korngrößenfraktionen im Vergleich zur Tonfraktion. Die beiden gröberen Fraktionen ($> 63 \mu\text{m}$, $20\text{-}63 \mu\text{m}$) wiesen in den T-RFLP-Profilen der Bakterien, Archaeen und Pilze z. B. spezifische Peaks auf, die nicht in der Tonfraktion vorkamen. Bei einer Kontamination mit Mikroorganismen aus diesen Fraktionen wären dagegen auch diese Peaks in den Profilen der Tonfraktion zu erwarten gewesen.

4.2 Methodische Aspekte: quantitative PCR

Die Quantifizierung mikrobiologischer Populationen in Böden ist problematisch, da sich nur ein geringer Anteil von ihnen auf Nährböden kultivieren lässt (Rappé & Giovannoni 2003). Andere Methoden der Quantifizierung beruhen auf der Ermittlung des mikrobiell gebundenen Kohlenstoffs (Moore *et al.* 2000, Böhme *et al.* 2005), einer Technik, die auch in dieser Arbeit angewandt wurde. Allerdings ermöglichen es diese Methoden nicht, genau zwischen den Populationen der Bakterien, Archaeen und Pilze zu unterscheiden. In dieser Arbeit wurde daher für dieses Ziel die quantitative PCR von SSU rRNA-Genen eingesetzt. Da alle lebenden Organismen über rRNA Gene verfügen und sich diese je nach phylogenetischer Verwandtschaft unterscheiden (Pace 1997, Rappé & Giovannoni 2003), kann man mit Hilfe geeigneter Primer-Systeme die drei Gruppen getrennt voneinander quantifizieren (Tebbe & Schlöter 2006). Die Limitierungen der Methoden bestehen darin, dass die Kopienzahlen der rRNA Gene bei verschiedenen Bakterien im Bereich von ein bis 15, bei Archaeen zwischen einem und vier und bei Pilzen sogar zwischen 50 und 200 liegen können und dadurch nicht die genauen Zellzahlen ermittelt werden (Haugland *et al.* 1999, Klappenbach *et al.* 2001, Ganley & Kobayashi 2007, Lee *et al.* 2009). Durch eine nicht ausreichende Lysis der Zellen im Boden bei der DNA-Extraktion könnten zudem einige Mikroorganismen nicht erfasst werden (von Wintzingerode *et al.* 1997). Schließlich werden möglicherweise einzelne Vertreter oder bestimmten Mikroorganismen-Gruppen aufgrund von Fehlpaarungen der Primer seltener amplifiziert als Gruppen, deren SSU rRNA-Genabschnitt perfekt mit den Primersequenzen übereinstimmt (Bru *et al.* 2008).

In den eigenen Untersuchungen konnten über die qPCR der SSU rRNA-Gene im Durchschnitt ca. 10^{10} Kopien von Bakterien, 10^8 bis 10^9 Kopien von Archaeen und ca. 10^8 Kopien von Pilzen pro g Boden nachgewiesen werden. Die Anwendung dieser Methode, allerdings z. T. unter Verwendung anderer Primer, ergab für landwirtschaftliche Böden ähnliche Ergebnisse (Hallin *et al.* 2009, Wessen *et al.* 2010a). Die Kopienzahlen waren damit wie erwartet deutlich höher als Zellzahlen, die mit Kultivierungsansätzen bestimmt wurden (Foster 1988) oder auch solche aus mikroskopischer Zählung (Taylor *et al.* 2002). Die ermittelten SSU rRNA-Genkopienzahlen spiegelten daher zwar nicht exakt die tatsächlichen Zellzahlen in den untersuchten Bodenvarianten wider, waren aber für den Vergleich der Mikroorganismen-Gemeinschaften in unterschiedlichen langzeitbehandelten Bodenvarianten und Korngrößenfraktionen geeignet. Für die Quantifizierung der Archaeen wurde auf zwei bereits publizierte Primer zurückgegriffen, die jedoch, soweit bekannt, hier zum ersten Mal

in Kombination eingesetzt wurden. Im Gegensatz zu den publizierten Primerpaaren erfassten diese auch einen Großteil der *Crenarchaeota* (vgl. 3.3.1.1). Die hier neu zusammengestellten Primer erzeugten im Vergleich zu den bisher verwendeten, darüber hinaus ein kleineres PCR-Produkt (ca. 200 bp), wodurch die Verwendung dieses Primerpaares die Effizienz der qPCR erhöhen dürfte (Smith *et al.* 2006). Die Primer waren allerdings nicht perfekt und exklusiv für den quantitativen Nachweis der *Archaea*, denn es zeigte sich, dass die PCR auch Sequenzen von Planctomyceten erfasste. Diese Gruppe gehört zu den *Bacteria*, ist jedoch im phylogenetischen System im Vergleich zu anderen Bakteriengruppen relativ nahe beim Abzweig zu den *Archaea* zu finden (Brochier & Philippe 2002). Der Anteil dieses Phylums in landwirtschaftlichen Böden wurde in anderen Untersuchungen ermittelt und betrug zwischen 3 und 7 % (Janssen 2006). Ein solcher Anteil würde bedeuten, dass die Genkopienzahlen für die Planctomyceten maximal bei etwa 10^9 Kopien g^{-1} Boden liegen könnten. Da die Kontamination der qPCR für *Archaea* mit Planctomyceten, wie sie mit Boden-DNA bei den eigenen Untersuchungen bestimmt wurde, jedoch nur 11 % betrug (vgl. Tab. 40), würde sich ein theoretischer Wert von maximal $1 \cdot 10^8$ Kopien g^{-1} Boden ergeben. Dieser Wert lag jedoch im Bereich der Standardabweichung der ermittelten *Archaea*-Kopienzahlen für die Bodenvarianten. Die Kontamination mit SSU rRNA-Genen aus Planctomyceten war damit zur Erklärung der ermittelten Unterschiede zwischen den Fraktionen und den Bodenvarianten zu vernachlässigen. Trotzdem sollte bei Aussagen über „Archaeen“ in dieser Arbeit, die aus qPCR Daten abgeleitet wurden, berücksichtigt werden, dass diese einen geringfügigen Anteil Planctomyceten mit einschließen können.

4.3 Veränderlichkeit der mikrobiellen Abundanz

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen einen deutlichen Zusammenhang zwischen den organischen Kohlenstoffgehalten der Bodenvarianten und der mikrobiellen Biomasse. Dies konnte anhand der ermittelten DNA-Gesamtgehalte ebenso wie über die Populationsgrößen der Bakterien, Archaeen und auch der Pilze in den drei Varianten (NIL, NPK, FYM) nachgewiesen werden. Sowohl die DNA-Gehalte als auch die SSU rRNA-Genkopienzahlen der drei Mikroorganismen-Gruppen nahmen mit den C_{org} -Gesamtgehalten der Bodenvarianten, also mit den Langzeitdüngungsstufen, zu und waren bei der organisch-mineralisch gedüngten Variante FYM immer signifikant höher als bei NIL. Die Werte der NPK-Variante lagen zwischen den beiden. Diese Abhängigkeiten zwischen organischem Kohlenstoff und SSU rRNA-Genkopien der jeweiligen Bodenvariante zeigten eine annähernd perfekte positive lineare Korrelation mit R^2 -Werten von 0,94 bis fast 0,99 (Abb. 66).

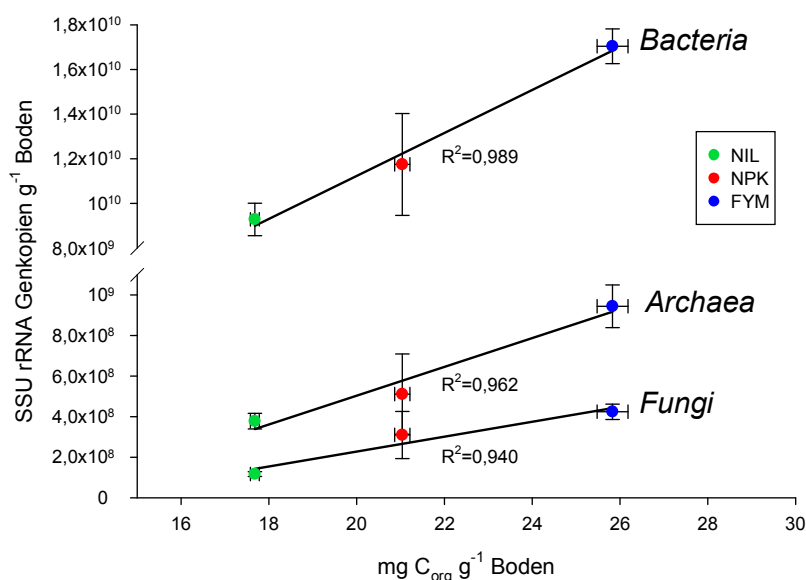


Abb. 66 Korrelationen zwischen der organischen Bodensubstanz und den SSU rRNA-Genkopienzahlen der *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi* der nicht-fractionierten Böden (Originaldaten aus Tab. 30 und Abb. 24 dieser Arbeit).

Ein Anstieg in der Mikroorganismen-Population als Folge der unterschiedlichen Langzeitbehandlungen konnte bereits in früheren Untersuchungen für die gleichen Bodenvarianten des Bad Lauchstädter Versuchs nachgewiesen werden (Kandeler *et al.* 1999a, Körschens *et al.* 2002, Vogt 2004, Böhme *et al.* 2005). Allerdings wurden bei diesen früheren Untersuchungen indirekte Nachweismethoden wie die Substrat-induzierte Respiration (SIR) oder Chloroform-Begasungs-Techniken (z. B. CFE) zur Bestimmung der mikrobiellen Biomasse eingesetzt. Diese Verfahren berücksichtigen jedoch weder den Beitrag von unterschiedlichen Mikroorganismen-Gruppen zur Biomasse noch ihre heterogene Verteilung auf unterschiedliche Mikrohabitate (Korngrößenfraktionen). Die in dieser Arbeit durchgeführte DNA-Analytik und Bestimmung von Populationsgrößen anhand von rRNA Genen erlaubte es dagegen, die Gruppe der Bakterien, Archaeen und Pilze getrennt voneinander und in unterschiedlichen Korngrößenfraktionen zu untersuchen. Zudem konnte die aus den Böden isolierte DNA auch für die Untersuchungen zur Diversität der Mikroorganismen-Gemeinschaften weiterverwendet werden. Dadurch war eine hohe Vergleichbarkeit der ermittelten quantitativen und qualitativen Daten gewährleistet.

Auch bei anderen Böden aus Langzeitdüngungsversuchen wurde über eine Zunahme der mikrobiellen Biomasse als Folge von steigenden Düngungsgaben berichtet (Peacock *et al.* 2001, Marschner *et al.* 2003), wobei hier sowohl indirekte Nachweismethoden als auch molekularbiologische Methoden eingesetzt wurden. Die eigenen Untersuchungen unterstreichen mit Hilfe der kultivierungsunabhängigen DNA-Analytik den deutlichen Zusammenhang zwischen organischem Kohlenstoff und der mikrobiellen Biomasse. Es stellt sich allerdings die Frage, ob die ermittelte hohe Korrelation zwischen organischer Substanz und den Populationsgrößen der Bakterien, Archaeen und Pilze eher ein Effekt der Langzeitdüngung ist, also mit der stark degradierten organischen Substanz korreliert, oder vor allem von kurzfristigen Düngungsereignissen beeinflusst wird. So können die

„kurzfristig“ durch Düngung bereitgestellten Nährstoffe von den Bodenlebewesen einerseits direkt verwertet werden. Durch die Erhöhung des Pflanzenertrags standen den Mikroorganismen andererseits aber auch indirekt größere Mengen an Nährstoffen in Form von abgestorbenem Material (z. B. Wurzelreste) zur Verfügung. Durch das zusätzliche organische Material werden heterotrophe Mikroorganismen, die diese Substrate insbesondere als Kohlenstoff- oder Energiequelle nutzen können, also ein großer Teil der Bakterien, Pilze und möglicherweise auch der Archaeen, in ihrem Wachstum gefördert. Neben dem jährlichen Neueintrag könnte jedoch die im Boden bereits festgelegte organische Substanz, deren Gehalt sich durch die über einen Zeitraum von mehr als 100 Jahren gleichbleibende Düngung in den Varianten NPK und FYM dauerhaft erhöhte (vgl. Tab. 30) für die Zunahme der Mikroorganismen-Populationen in den untersuchten Bodenvarianten von entscheidender Bedeutung sein. Der Pool an festgelegtem C_{org} stellt dabei sowohl ein Reservoir für Nährstoffe, die langsam freigesetzt werden, als auch ein wichtiges Strukturmaterial, d. h. eine Matrix auf mineralischen Partikeln, die von Mikroorganismen besiedelt werden kann, dar.

Während der Zusammenhang zwischen organischem Kohlenstoff und der mikrobiellen Biomasse für Bakterien und Pilze eigentlich schon zum bodenmikrobiologischen Allgemeinwissen gehört (Paul 2007, Blume *et al.* 2010), ist er für die bisher kaum untersuchte Gruppe der Archaeen noch relativ neu. In Übereinstimmung mit den eigenen qPCR-Analysen wurden in Untersuchungen von Gattinger *et al.* (2007) mit Phospholipid-Analysen, also Zellwandbestandteilen, bereits positive Korrelationen zwischen der organischen Substanz und der Abundanz von Archaeen für den Bad Lauchstädter Boden ermittelt. Dabei wiesen die gedüngten Varianten größere Mengen an Etherlipiden, charakteristischen Zellbestandteilen der *Archaea*, auf (Gattinger *et al.* 2007). Ein heterotrophes Wachstum einiger Boden-Archaeen wurde bereits vermutet, konnte aber bisher nicht eindeutig experimentell belegt werden (Zhang *et al.* 2010). Daher beruhte der ermittelte Anstieg ihrer Population in den gedüngten Böden vermutlich nicht allein auf den unterschiedlichen C_{org} -Gehalten, sondern war auch auf eine höhere Nährstoffverfügbarkeit in den Varianten NPK und FYM zurückzuführen. Da einige Boden-Archaeen vermutlich eine Schlüsselrolle bei der Nitrifikation im Boden einnehmen und ihre Energie aus der Ammoniumoxidation gewinnen (Schleper *et al.* 2005), könnte z. B. der im Dünger enthaltene Stickstoff zu einer Zunahme dieser Populationen bei NPK und FYM geführt haben. Damit übereinstimmend konnte bereits zuvor für den Versuchsboden ein Anstieg der *Archaea*-spezifischen Ammoniummonooxygenase-Gene (*amoA*) mit dem Düngungsgrad über die qPCR ermittelt werden (Leininger *et al.* 2006). Im Gegensatz zu den *amoA* Analysen erfasst das in den eigenen Untersuchungen verwendete Primersystem jedoch alle Archaeen und nicht nur die potenziellen Ammonium-Oxidierer. Entsprechend waren auch die Kopienzahlen von $4 \text{ bis } 9 \cdot 10^8 \text{ g}^{-1}$ im Vergleich zu $5 \text{ bis } 7 \cdot 10^7 \text{ amoA Kopien g}^{-1}$ im Versuchsboden (Leininger *et al.* 2006) deutlich höher. Der Unterschied von einer Zehnerpotenz zeigte jedoch auch, dass die Zunahme der Archaeen-Population in den gedüngten Varianten nicht allein durch den Anstieg der Ammonium-Oxidierer zu erklären war. Es wäre vorstellbar, dass viele Archaeen indirekt von dem Anstieg der C_{org} -Gehalte

profitieren, indem sie z. B. Stoffwechselprodukte der Bakterien und Pilze, wie z. B. Acetat oder CO₂ weiter verwerten. Möglicherweise könnten hier Versuche mit ¹³C-markierten Substanzen und der SIP-Methode (vgl. 2.5.7) zukünftig weiteren Aufschluss bieten.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Bodenfraktionierungsverfahrens gelang es, Korngrößenfraktionen zu erhalten, ohne die anhaftende mikrobielle Biomasse abzulösen (siehe oben). Dabei zeigte sich, dass für alle vier Partikelfraktionen (> 63 µm, 20-63 µm, 2-20 µm, < 2 µm) unabhängig von der jeweiligen Bodenvariante, eine charakteristische, gleiche Verteilung der mikrobiellen Biomasse vorlag. Dies zeigte sich sowohl bei den DNA-Gesamtgehalten als auch bei den Werten, die über qPCR ermittelt wurden. Der überwiegende Anteil der DNA (79 bis 88 %) war mit der Tonfraktion (< 2 µm) assoziiert. Der DNA-Anteil in der Grobschlufffraktion (20-63 µm) betrug dagegen nur 2 bis 5 % und war damit im Vergleich zu den übrigen Fraktionen immer am niedrigsten. Diese Unterschiede bestanden genauso für die SSU rRNA-Genkopienzahlen der Bakterien, Archaeen und Pilze. Die Verteilung der mikrobiellen Biomasse, wie sie hier ermittelt wurde, ist mit den physikochemischen Eigenschaften der Mikroaggregate und deren Abhängigkeit von den Korngrößen zu erklären (Six *et al.* 2004). Eine wichtige Rolle spielten dabei die Größe der Partikel-Oberflächen und die C_{org}-Gehalte, wie sich an ihrer positiven Korrelation mit den DNA-Gehalten und SSU rRNA-Genkopienzahlen in den Fraktionen zeigte (Tab. 53).

Tab. 53 Korrelationskoeffizienten (R^2) der Beziehung zwischen dem DNA-Gehalt ($\mu\text{g g}^{-1}$ Boden) bzw. den SSU rRNA-Genkopienzahlen (Kopien g^{-1} Boden) mit dem C_{org}-Gehalt (mg g^{-1} Boden) bzw. der spezifischen Oberfläche ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ Boden) der Korngrößenfraktionen (Original-Daten aus Abb. 16, 25 und Tab. 50, 51 dieser Arbeit).

Korrelation mit:	DNA			SSU rRNA-Genkopienzahlen								
	NIL	NPK	FYM	Bacteria			Archaea			Fungi		
	NIL	NPK	FYM	NIL	NPK	FYM	NIL	NPK	FYM	NIL	NPK	FYM
Oberfläche	0,95	0,96	0,98	0,93	0,96	0,96	0,95	0,96	0,98	0,96	0,89	0,91
C _{org}	0,87	0,81	0,86	0,85	0,81	0,82	0,88	0,81	0,87	0,89	0,71	0,76

Dieser eindeutige Zusammenhang unterstreicht die Bedeutung der Oberfläche der Bodenmineralpartikel und der C_{org}-Gehalte als Lebensgrundlage für alle Bodenmikroorganismen (Bakterien, Archaeen und Pilze). Die Partikel-Oberflächen dienen als Anheftungspunkt in der Bodenmatrix. Durch die Anlagerung sind die Mikroorganismen auch vor Umweltstress wie z. B. Schwermetallen (Babich *et al.* 1980) oder Antibiotika häufig besser geschützt (Blume *et al.* 2010). Gleichzeitig ist mit der Oberfläche aber auch ein Großteil der organischen Substanz assoziiert, die die wesentliche Energie- und Nahrungsquelle für die Mikroorganismen im Boden darstellt (Amato & Ladd 1992) bzw. eine geeignete Anheftungsmatrix bietet (Six *et al.* 2004). Da die Partikel in der Tonfraktion ihnen mit den größten Oberflächen und den höchsten Gehalten an organischer Substanz (vgl. Tab. 50, Tab. 51) mehr Platz und Nahrung als die in den gröberen Fraktionen boten, reicherten sich in dieser die meisten Mikroorganismen an. Bei der Grobschlufffraktion mit den kleinsten Partikel-Oberflächen und den niedrigsten C_{org}-Gehalten verhielt es sich dagegen umgekehrt.

Die molekularbiologische Untersuchung der Korngrößenfraktionen bestätigte damit insgesamt die Zunahme der mikrobiellen Biomasse als Folge der Langzeitdüngung. Sowohl die DNA-Gehalte, als auch die Populationsgrößen der Bakterien, Archaeen und Pilze stiegen ähnlich wie in den nicht-fraktionierten Böden in drei der vier Fraktionen mit dem Düngungsgrad an und waren bei deren FYM-Varianten immer signifikant höher als bei NIL (vgl. Abb. 16, Abb. 25). Die Zunahme der Populationen war mit den höheren Mengen an organischer Substanz, die den Mikroorganismen in allen Korngrößenfraktionen außer dem Ton ($< 2 \mu\text{m}$) zur Verfügung stand (vgl. Tab. 51), zu erklären. Die eindeutig positive Korrelation der SSU rRNA-Genkopienzahlen mit den C_{org} -Gehalten bestätigte diesen Zusammenhang (Tab. 54). Die DNA-Gehalte und die Anzahl der Mikroorganismen in der Tonfraktion unterschieden sich dagegen nicht zwischen den drei Bodenvarianten, was mit den ebenfalls nicht signifikant unterschiedlichen C_{org} -Gehalten dieser Fraktion übereinstimmte.

Tab. 54 Korrelationskoeffizienten (R^2) der Beziehung zwischen dem C_{org} -Gehalt (mg g^{-1} Boden) in den vier Korngrößenfraktionen und den SSU rRNA-Genkopienzahlen (Kopien g^{-1} Boden) der *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi* der drei Bodenvarianten (Original-Daten aus Tab. 51 und Abb. 25).

	$> 63 \mu\text{m}$	$20-63 \mu\text{m}$	$2-20 \mu\text{m}$	$< 2 \mu\text{m}$
<i>Bacteria</i>	0,99	0,73	0,92	0,01
<i>Archaea</i>	1,00	0,78	0,63	0,01
<i>Fungi</i>	0,45	0,07	1,00	0,10

Die Populationsgrößen der prokaryotischen Organismen, d. h. der Bakterien und Archaeen, zeigten eine stärkere Abhängigkeit von den C_{org} -Gehalten in den Fraktionen als die Pilze (Tab. 54). Eine Erklärung hierfür könnte die unterschiedliche Verbreitungsform dieser Mikroorganismen-Gruppen darstellen. Während sich die einzelligen Bakterien und Archaeen bei der Nahrungsaufnahme dicht an ihrem Substrat und daher direkt an den entsprechenden Bodenpartikeln befinden, gilt dies nur eingeschränkt für die Pilze. So können mehrzellige Pilze durch die Ausbildung von Hyphen, die in Richtung eines Substrats wachsen, auch Nährstoffe an entfernteren Orten in der Bodenmatrix erreichen, ohne mit ihrer vollständigen Biomasse in direkten Kontakt mit diesen Partikeln zu treten. Diese im Vergleich zu den Bakterien und Archaeen stärkere Unabhängigkeit von dem Ort, an dem sich ihre Nahrung befindet, könnte daher zu der ermittelten niedrigeren Korrelation mit den C_{org} -Gehalten bei den beiden gröberen Fraktionen ($> 63 \mu\text{m}$, $20-63 \mu\text{m}$) geführt haben. Für die Feinschlufffraktion ($2-20 \mu\text{m}$) zeigte sich jedoch auch bei den Pilzpopulationen ein deutlicher Zusammenhang mit dem C_{org} . Dies könnte daran liegen, dass mit den Bodenpartikeln dieser Fraktion möglicherweise bevorzugt einzellig wachsende Pilze wie z. B. Hefen assoziiert sind. Hinweise auf das Vorkommen solcher Hefen ergaben sich aus den Sequenzierungen von rRNA-Genen im Rahmen dieser Arbeit, z.B. von *Cryptococcus* bei den Abbauuntersuchungen mit Phenol (vgl. Tab. 48, Abb. 58). Tatsächlich gelangen Pilz-Hyphen aufgrund ihrer Größe dagegen für gewöhnlich nicht in das Innere von Mikroaggregaten (Ritz & Young 2004), in denen ein Großteil der feineren Partikel eingeschlossen ist.

Die qPCR-Analysen zeigten, dass sich Bakterien, Archaeen und Pilze nicht gleichmäßig auf die verschiedenen Korngrößen verteilen. Trotz der offensichtlich unterschiedlichen Lebensweise von Bakterien und Archaeen waren die Verhältnisse zueinander relativ konstant (Abb. 67 A). Jedoch war der Anteil der Archaeen gegenüber denen der Bakterien in der Tonfraktion mit den höchsten C_{org} -Gehalten signifikant erhöht. Offensichtlich bietet der größere C_{org} -Anteil daher in diesem Mikrokompartment bessere Bedingungen für die Archaeen. Da Archaeen eine ähnliche Zellgröße wie die Bakterien aufweisen, ist anzunehmen, dass beide Gruppen vergleichbare Nischen und Lebensräume in den Bodenaggregaten besetzen können. Möglicherweise sind die Archaeen an die Bedingungen in den feineren Fraktionen jedoch besser angepasst als die Bakterien. Die unveränderte Mikroorganismen-Abundanz und die gleichen C_{org} -Gehalte in der Tonfraktion deuteten darauf hin, dass die dort vorliegenden Mikroorganismen nicht durch eine direkte Nährstoffzufuhr von außen beeinflusst werden. Da das organische Material an den Bodenpartikeln zum Teil vor einem mikrobiellen Abbau geschützt ist (Gregorich *et al.* 1989), könnte das vorwiegend autotrophe Wachstum der Archaeen ihnen hier einen Vorteil gegenüber den Bakterien verschaffen. Auch eine im Vergleich zu den Bakterien bessere Anpassung an anaerobe Bedingungen durch den Sauerstoffverbrauch in den feineren Fraktionen wäre denkbar.

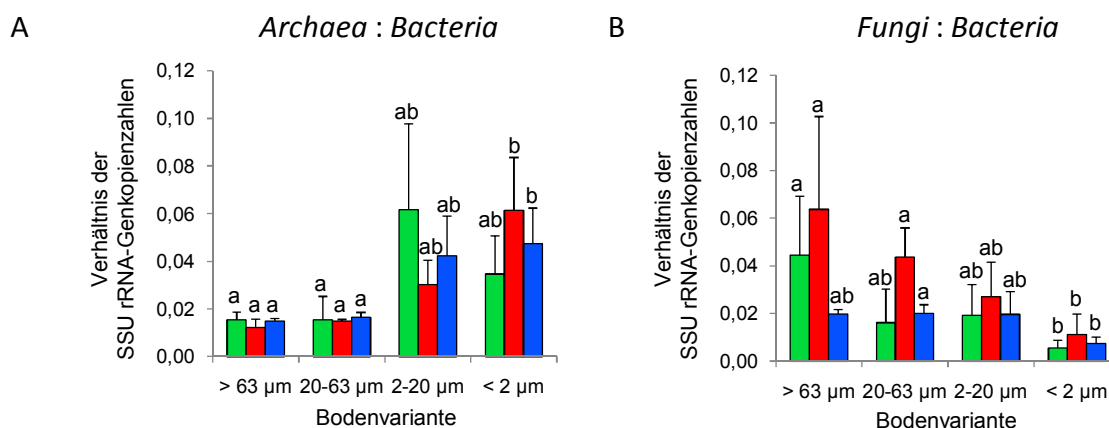


Abb. 67 Verhältnis der SSU rRNA-Genkopienzahlen der (A) *Archaea : Bacteria* und der (B) *Fungi : Bacteria* in den Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM. Kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den entsprechenden Verhältnissen.

Auch die Pilze traten bevorzugt mit der Tonfraktion assoziiert auf, wie an den qPCR-Daten erkennbar war. Ihre Abundanz in dieser Partikelfraktion war dabei deutlich höher als es in vorhergehenden Untersuchungen z. B. anhand von Pilz-spezifischen Enzymen ermittelt wurde (Kandeler *et al.* 2000). Tatsächlich zeigte jedoch der Nachweis von Pilz-charakteristischen Ergosterol-Molekülen in einer anderen Untersuchung, dass Pilze durchaus auch in höheren Mengen mit den feineren Partikelfractionen assoziiert sein können. Die Ergosterol-Gehalte pro Gramm einer 0,2-2 µm Fraktion aus Grünlandböden entsprachen dabei denen der gröberen Fraktionen (2-53 µm, 53-250 µm) (Chiu *et al.* 2006). Möglicherweise spielen Pilze daher nicht nur eine Rolle bei der Bildung von Makroaggregaten sondern liegen auch in Mikroaggregaten vor, wo sie eine bislang noch

unbekannte Funktion ausüben (Rillig & Mummey 2006). Jedoch wäre es auch denkbar, dass die ermittelten Populationsgrößen nicht der natürlichen Verteilung der Pilze auf die Fraktionen widerspiegeln. Die Pilze bzw. ihre Hyphen und deren Ausscheidungsprodukte spielen eine wichtige Rolle bei der Vernetzung der Mikroaggregate zu Makroaggregaten (Blume *et al.* 2010). Möglicherweise wurden daher in den eigenen Untersuchungen einige der Pilz-Hyphen während der Ultraschallbehandlung bei der Dispersion der Aggregate und dem nachfolgenden Siebschritt zerstört. Myzel-Bruchstücke könnten dann während der weiteren Aufarbeitung in die Tonfraktion verschleppt worden sein. Dort könnte ihre DNA bei der Extraktion von den Tonmineralen sorbiert werden, was zu einer größeren Menge an Pilz-DNA in dieser Fraktion und zu einer Erhöhung der SSU rRNA-Genkopienzahlen führte.

Im Gegensatz zu den Bakterien und Archaeen waren die Pilze jedoch auch stark mit der grobkörnigen Fraktion ($> 63 \mu\text{m}$) verbunden. Dies zeigte sich an ihrem im Vergleich zu den Bakterien tendenziell höheren Anteil in dieser Fraktion (Abb. 67 B). Eine Erklärung hierfür ist vor allem ihre Assoziation mit dem in dieser Fraktion vorliegenden noch wenig prozessierten Pflanzenmaterial, dessen hochmolekularen Bestandteile von den Pilzen als Nahrung genutzt werden kann.

4.4 Einfluss des organischen Kohlenstoffs auf die mikrobielle Vielfalt in den Bodenvarianten und ihren Korngrößenfraktionen

Die Bakterien- und Pilz-Gemeinschaften wiesen eine charakteristische strukturelle Diversität in den untersuchten Bodenvarianten auf, die sich in einer Anzahl von bis zu 35 Restriktionsfragmenten in ihren T-RFLP-Profilen zeigte. Die strukturelle Diversität der Archaeen-Gemeinschaften war mit nur sechs dominanten und maximal 12 sichtbaren Restriktionsfragmenten in den T-RFLP-Profilen dagegen deutlich niedriger. Ähnliches wurde auch zuvor schon bei anderen Untersuchungen dieser Gruppe in Böden über die T-RFLP-Technik, bei denen andere Restriktionsendonucleasen benutzt wurden, beobachtet (Kemnitz *et al.* 2007). Offensichtlich ist die Diversität der Archaeen in den Böden niedriger als die der Bakterien und Pilze und die Gemeinschaften sind nur durch einige wenige dominante Arten geprägt. Tatsächlich zeigten inzwischen auch einige andere Arbeiten, dass die Archaeen in landwirtschaftlichen Böden überwiegend einer einzigen Gruppe („Gruppe 1.1b“) aus der Abteilung der *Crenarchaeota* zuzuordnen sind und aus dieser wiederum nur wenige Arten in hoher Abundanz vorliegen (Auguet *et al.* 2010, Bates *et al.* 2010).

Nicht nur die Populationsgröße sondern auch die Zusammensetzung der Mikroorganismen-Gemeinschaften im Versuchsboden wurde durch die unterschiedliche Langzeitdüngung und die damit verbundenen C_{org} -Gehalte beeinflusst. Dies konnte für alle drei untersuchten Gruppen, also für die Bakterien, Archaeen und Pilze, über die T-RFLP Technik nachgewiesen werden. Die Ähnlichkeitsanalysen der Bakterien-Gemeinschaften des nicht-fraktionierten Bodens zeigten jedoch keine eindeutige Zuordnung der Profile in Abhängigkeit von der

Bodenvariante. Zwar bildeten hier drei der vier FYM-Profile ein eigenes Cluster, die Unterschiede zwischen den drei Bodenvarianten, wie sie über den Permutationstest bestimmt wurden, waren jedoch nicht signifikant (vgl. Anhang Tab. 56). Dies hing vermutlich mit der im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen höheren Anzahl an verwertbaren Restriktionsfragmenten in den genetischen Profilen und der generell höheren Vielfalt der Bodenbakterien zusammen. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass die sogenannten Fingerprinting-Methoden (wie T-RFLP, DGGE, SSCP) lediglich einen kleinen Ausschnitt der tatsächlich vorhandenen mikrobiellen Vielfalt, in der Regel die Verteilung der dominanten Mitglieder, widerspiegeln (Smalla *et al.* 2007). Mit der T-RFLP-Technik können z. B. maximal etwa 50 unterschiedliche DNA-Fragmente dargestellt und unterschieden werden (Kim 2004). Die in einem hochdiversen System wie dem Boden (Torsvik *et al.* 1990) auftretenden Fragmente in derartigen Profilen entsprechen daher Bakterien, die in sehr hoher Abundanz vorliegen, während seltenere Vertreter nicht sichtbar sind. Über Microarray-Analysen auf Grundlage von SSU rRNA-Gen-Sonden (Phylochip®, DeSantis *et al.* 2007) erfolgte in parallelen Arbeiten eine detailliertere Untersuchung der Bakterien-Gemeinschaften in den gleichen DNA-Extrakten die hier untersucht wurden. Hierbei konnten signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der Bakterien-Gemeinschaften zwischen NIL, NPK und FYM in Abhängigkeit vom organischen Kohlenstoffgehalt gefunden werden (C. Tebbe, persönliche Mitteilung). Dies bestätigte, dass sich die Bakterien-Zusammensetzung in dem Versuchsboden in den Bodenvarianten langfristig verändert hatte, obwohl dies mit der T-RFLP-Technik aufgrund des sehr begrenzten Auflösungsvermögens nicht gezeigt werden konnte. Gleichzeitig heißt dies aber auch, dass die dominanten Bakterien im Boden offensichtlich nicht sehr stark auf die Langzeitdüngung und die damit verbunden, veränderten C_{org}-Gehalte reagierten.

Die Ergebnisse der T-RFLP Analysen der nicht-fraktionierten Böden spiegelten sich auch in der Diversität der Bakterien-Gemeinschaften in den Korngrößenfraktionen wider, jedoch gab es hier interessante neue Aspekte. Die T-RFLP-Profile der Feinschluff- (2-20 µm) und der Tonfraktion (< 2 µm), die die höchsten Bakterienzahlen pro Gramm Boden enthielten, wiesen keine Unterschiede zwischen den drei Bodenvarianten auf (vgl. Abb. 32, Abb. 33). Aufgrund der höchsten Bakterien-Abundanz in der Tonfraktion ähnelten die genetischen Profile dieser Fraktion tatsächlich auch stark denen der nicht-fraktionierten Böden. Dies war wiederum ein Hinweis darauf, wie spezifisch und gut die Fraktionierungsmethode funktionierte. Die große Bedeutung der Tonfraktion für die mikrobielle Vielfalt wurde zuvor auch schon bei anderen Bodentypen vermutet bzw. festgestellt (Kandeler *et al.* 2000, Ranjard *et al.* 2000, Uyttebroek *et al.* 2006). Die eigenen Untersuchungen zeigen aber auch, dass die Zusammensetzung der dominanten Bakterien in den zwei gröberen Fraktionen (> 63 µm, 20-63 µm) eindeutig durch die Bodenvariante beeinflusst wurde. NIL, NPK, und FYM wiesen getrennte Cluster auf. Damit zeigte sich, dass die gröberen Partikelfraktionen responsiver waren, was vermutlich mit der leichteren Verfügbarkeit von C_{org} in diesen Fraktionen im Vergleich zu den feineren mit weiter degradiertem C_{org} zusammenhing. Dies wird im folgenden Abschnitt weiter diskutiert.

Insgesamt wiesen die Korngrößenfraktionen einen stärkeren Einfluss auf die Diversität der Bakterien-Gemeinschaften auf als die Langzeitdüngungsvarianten. Dies zeigte sich in der kombinierten Analyse aller T-RFLP Profile an den zwei klar voneinander getrennten Clustern, in denen jeweils die T-RFLP-Profile der beiden gröberen ($> 63 \mu\text{m}$, $20\text{-}63 \mu\text{m}$) und der beiden feineren Fraktionen ($2\text{-}20 \mu\text{m}$, $< 2 \mu\text{m}$) eingeordnet wurden. Auch die Gemeinschaften in der Feinschlufffraktion ($2\text{-}20 \mu\text{m}$) und der Tonfraktion ($< 2 \mu\text{m}$) unterschieden sich voneinander, denn ihre T-RFLP-Profile bildeten jeweils eine eigene Gruppe innerhalb des Clusters. Die unterschiedliche Diversität in Abhängigkeit von Bodenvariante und Korngröße lässt sich mit dem unterschiedlichen Nährstoffeintrag bei NIL, NPK und FYM erklären. Dabei waren vermutlich vor allem die Unterschiede im C_{org} -Gehalt von Bedeutung, denn durch die unterschiedliche Langzeitdüngung veränderte sich das den Mikroorganismen zur Verfügung stehende organische Ausgangsmaterial sowohl in seiner Menge als auch in der Qualität. Dies galt insbesondere für die FYM-Variante, bei der zusätzliches organisches Material als Dünger eingebracht wurde. Die mit der Düngung zunehmenden C_{org} -Gehalte könnten daher nicht nur die Populationsgrößen, wie es mit der qPCR nachgewiesen wurde, sondern auch die Diversität der Bakterien beeinflusst haben. Damit übereinstimmend konnte z. B. in einer Untersuchung mit verschiedenen Böden gezeigt werden, dass einige Bakterien-Gruppen durch eine höhere Kohlenstoff-Verfügbarkeit in ihrem Wachstum gefördert, andere Gruppen dagegen gehemmt werden (Fierer *et al.* 2007). Die eigenen Analysen weisen jedoch darauf hin, dass bei den Bakterien auch die Zusammensetzung des C_{org} eine Rolle spielte. Das mit Bodenpartikeln assoziierte organische Material, das den Mikroorganismen als Nahrungs- und Energiequelle zur Verfügung steht, ist in gröberen Fraktionen generell weniger stark degradiert und verändert und damit deutlich heterogener als in den feineren Fraktionen (Chefetz *et al.* 2002). Daher ist anzunehmen, dass sich an unterschiedlichen Korngrößen charakteristische Mikroorganismen-Gemeinschaften ansiedelten, welche die jeweils vorliegenden spezifischen Substrate verwerten. Dies könnte die in dieser Arbeit ermittelten Unterschiede in der Diversität zwischen den vier Korngrößenfraktionen erklären. Durch die unterschiedliche Qualität des C_{org} in den drei Bodenvarianten reicherten sich an den Partikeln $> 20 \mu\text{m}$ vermutlich jeweils unterschiedliche Bakterien-Gruppen an. Bei den Partikeln $< 20 \mu\text{m}$ könnten dagegen ähnlichere bzw. vergleichbarere Oxidationsprodukte zu einer Besiedlung durch die gleichen dominanten Bakterien-Gruppen geführt haben. Dies würde erklären, warum sich die Diversität der Bakterien-Gemeinschaften in den gröberen Fraktionen, nicht aber die der feineren Fraktionen, in Abhängigkeit von der Bodenvariante unterschied. Allerdings könnten die vergleichbaren Bakterien-Gemeinschaften an den beiden feineren Fraktionen auch indirekt durch die hohen C_{org} -Gehalte verursacht worden sein. Der C_{org} könnte dabei in erster Linie eine Funktion als Matrix für die mikrobielle Besiedlung erfüllen. Die fehlende Selektivität der unterschiedlichen Langzeitdüngungen für Mikroorganismen an der Tonfraktion findet sich nicht nur in den T-RFLP Daten wieder sondern auch bei den qPCR Ergebnissen, die sich bei NIL, NPK und FYM ebenfalls nicht unterschieden (vgl. 4.3).

Übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen, konnte in einer früheren Untersuchung mit Hilfe von T-RFLP auch für eine Braunerde gezeigt werden, dass die Diversität von Bakterien

durch die Korngröße beeinflusst wird und unterschiedliche Langzeitbehandlungen des Bodens nur geringe Auswirkungen hatten (Sessitsch *et al.* 2001). Die Autoren konnten die Unterschiede zwischen den Korngrößen dabei auf eine abnehmende Anzahl an Restriktionsfragmenten in den gröberen Fraktionen zurückführen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den eigenen Untersuchungen für die Bodenvarianten kein derartiger Trend, denn die Anzahl der sichtbaren Restriktionsfragmente auf den T-RFLP-Profilen unterschied sich nicht signifikant zwischen den vier Korngrößenfraktionen. Dies deutete darauf hin, dass die Bedingungen an den Korngrößen in dem eigenen Versuchsboden offenbar zu einer stärkeren Selektion von bestimmten Bakterien-Gemeinschaften führten. In einer anderen Studie, bei der Bodenvarianten eines Phaeozems verglichen wurden, konnten über T-RFLP dagegen keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der Bakterien-Gemeinschaften in Korngrößenfraktionen gefunden werden (Poll *et al.* 2003). Einzige Ausnahme bildete dabei eine Grobsandfraktion ($> 250 \mu\text{m}$), bei der eine niedrigere Anzahl an Restriktionsfragmenten in den Profilen sichtbar war. Auch eine organische Langzeitdüngung mit Stallmist (FYM) wirkte sich bei den genannten Untersuchungen von Poll *et al.* nur auf die Diversität der Mikroorganismen-Gemeinschaften in dieser Fraktion aus. In den eigenen Arbeiten konnten trotz der vergleichbaren untersuchten Korngrößen und Bodenvarianten des Versuchsbodens dagegen eindeutige Unterschiede zwischen den Bakterien-Gemeinschaften mit der T-RFLP ermittelt werden. Möglicherweise ist dies durch die Amplifikation eines längeren DNA-Abschnitts (938 bp im Vergleich zu 530 bp) und die Verwendung von drei getrennten Ansätzen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen zu erklären. Hierdurch könnte eine höhere Anzahl an unterschiedlichen Restriktionsfragmenten generiert worden sein, so dass sich die Auflösung erhöhte und die Unterschiede zwischen den Korngrößen und Bodenvarianten stärker herausgestellt wurden.

Trotz der geringeren Vielfalt der Archaeen T-RFLP-Profile ergaben die Ähnlichkeitsanalysen des nicht-fraktionierten Bodens, mit der Ausnahme von zwei offensichtlichen Ausreißern bei NPK, eine deutliche Trennung zwischen den FYM-Varianten und den beiden anderen (NIL, NPK). Die Signifikanz-Analysen bestätigten die Unterschiede zwischen NIL und FYM (vgl. Tab. 56). Diese Ergebnisse stimmten mit denen für die Korngrößenfraktionen überein. Genau wie für den nicht-fraktionierten Boden waren hier Unterschiede zwischen den T-RFLP-Profilen der Bodenvarianten zu erkennen, die durch die Ähnlichkeitsanalysen bestätigt wurden (vgl. Abb. 34, Abb. 35). Dabei bildeten die FYM-Varianten der vier Korngrößenfraktionen erneut getrennte Cluster zu NIL bzw. NPK. Diese Unterschiede deuteten daher darauf hin, dass einige Archaeen-Gruppen in Folge des unterschiedlichen Nährstoffeintrags offenbar stärker gefördert wurden als andere. Heterotroph wachsende Archaeen, wie sie im Boden vermutet werden, könnten dabei ähnlich wie die Bakterien durch unterschiedliche Gehalte und die Zusammensetzung des C_{org} in ihrer Diversität beeinflusst worden sein. Übereinstimmend mit den eigenen Untersuchungen konnte für den Versuchsboden auch zuvor schon gezeigt werden, dass sich die Diversität von bestimmten Archaeen-Gruppen in Folge der organischen Düngung mit Stallmist (FYM) veränderte (Gattinger *et al.* 2007). Das Wachstum bestimmter autotropher Archaeen im Boden, wie z. B. das der Ammoniumoxidierer, wurde dagegen möglicherweise auch durch

die anorganische Düngung gefördert (Prosser & Nicol 2008). Eine höhere Anreicherung von Mineralstoffen und deren vermutlich heterogene Verteilung auf die Korngrößen könnten sich dabei auf die Populationsgrößen dieser Archaeen-Gruppen in bestimmten Fraktionen bzw. Bodenvarianten auswirken und damit auch ihre Diversität beeinflussen. Auf eine solche „Verschiebung“ der Gemeinschaften deutete die unterschiedliche Abundanz der Restriktionsfragmente auf den T-RFLP-Profilen hin.

Die Pilze wurden im Vergleich zu den Bakterien und Archaeen am stärksten durch die unterschiedliche Langzeitbehandlung in ihrer Diversität beeinflusst. Dies zeigte sich an den Unterschieden zwischen den T-RFLP-Profilen von NIL, NPK und FYM, die durch die Ähnlichkeitsanalysen bestätigt wurden. Für die nicht-fraktionierten Böden ergab sich dabei eine klare Aufteilung nach der Bodenvariante und diese Unterschiede waren, wie der Permutationstest zeigte, signifikant (vgl. Tab. 56). Die Diversität der Pilz-Gemeinschaften schien dabei mit steigender Düngung abzunehmen. So wiesen die FYM-Profile weniger dominante und eine tendenziell niedrigere Anzahl an sichtbaren Restriktionsfragmenten in ihren T-RFLP-Profilen im Vergleich zu den beiden anderen Varianten auf. Eine Erklärung für die abnehmende Diversität könnte z. B. die stärkere Förderung bestimmter Pilzarten sein, die durch den höheren C-Eintrag schneller wachsen und so langsamer wachsende Arten verdrängen.

Im Gegensatz zu den Bakterien und Archaeen wurde die Zusammensetzung der Pilz-Gemeinschaften in den Fraktionen stärker durch die Bodenvariante, als durch eine unterschiedliche Korngröße beeinflusst. Dies zeigte sich daran, dass alle T-RFLP-Profile der FYM-Varianten in ein von den beiden anderen Bodenvarianten getrenntes Cluster eingeordnet wurden. Die unterschiedliche Langzeitbehandlung wirkte sich demnach offenbar auf ähnliche Weise auf die Diversität der Pilze in den vier untersuchten Korngrößenfraktionen aus. Eine Erklärung hierfür ist der Größenunterschied der Pilze im Vergleich zu den Prokaryoten und ihre Verbreitungsform. Durch das filamentöse Wachstum sind vermutlich Teile desselben Pilzes im Boden gleichzeitig mit mehreren Partikelgrößen assoziiert. Nach der Aufarbeitung der Proben waren daher Teile dieser Pilze und folglich auch ihre DNA in mehreren unterschiedlichen Korngrößenfraktionen zu finden. Trotz der Unterschiede wie sie mit der qPCR erzielt wurden, ist möglicherweise die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Fraktionierungsmethode für die Gruppe der Bakterien und Archaeen besser geeignet als für die Pilze.

4.5 Sorption von Phenol und 2,4-DCP am nicht-fraktionierten Boden und an den Korngrößenfraktionen

Phenol und 2,4-DCP verteilten sich nach ihrer Zugabe unterschiedlich in den verschiedenen Bodenvarianten. Dies konnte durch die Bestimmung der ^{14}C -Aktivität der markierten Schadstoffe im Boden und der wässrigen Bodenlösung mit den Sorptionsversuchen nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich, dass bei gleichen Ausgangskonzentrationen und

unabhängig von der Bodenvariante im Vergleich immer mehr 2,4-DCP als Phenol an die nicht-fraktionierten Böden sorbierte (vgl. Abb. 38). Die ermittelten Verteilungskoeffizienten (K_d), die beim 2,4-DCP bei gleichen Konzentrationen ebenfalls höher waren als die des Phenols, gaben ein quantitatives Maß für die höhere Affinität des 2,4-DCP zur Sorption an die Böden. Das Phenol war dagegen in der wässrigen Bodenlösung deutlich mobiler. Die Unterschiede im Sorptionsverhalten der beiden Substanzen beruhen auf ihren unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Beide Verbindungen unterscheiden sich deutlich in ihrer Wasserlöslichkeit (2,4-DCP < Phenol), wie sie auch im Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (K_{ow}) zum Ausdruck kommt (vgl. Tab. 1). Der K_{ow} -Wert ist ein Maß für das Verhältnis zwischen Lipophilie (Fettlöslichkeit) und Hydrophilie (Wasserlöslichkeit) einer Verbindung. Mit einem $\log K_{ow}$ von 3,17 (Phenol) im Vergleich zu 1,50 (LOGKOW®-Datenbank, <http://logkow.cisti.nrc.ca>) ist 2,4-DCP dabei lipophiler als Phenol. Da sich die organische Substanz im Boden im Allgemeinen eher wie eine lipophile Phase verhält (Chiou *et al.* 1979, 1981), trat 2,4-DCP vermutlich in stärkere Wechselwirkungen mit der organischen Substanz an den Bodenpartikeln als das Phenol, was zu den unterschiedlichen sorbierten Mengen führte. Über einen solchen Zusammenhang zwischen den chemischen Eigenschaften und der sorbierten Menge von Phenol und phenolischen Verbindungen an Böden bzw. Sedimenten wurde bereits früher berichtet. So untersuchte Boyd (1982) z. B. die Sorption von Phenol und seiner Derivate in einem Boden, um den Einfluss von anderen funktionellen Gruppen im Phenolmolekül bei diesem Prozess zu charakterisieren. Dabei zeigte sich u. a., dass Chlorphenole unabhängig von der Position der -Cl-Gruppe jeweils stärker am Boden sorbierten als Phenol (Boyd 1982). Isaacson & Frink (1984) verglichen dagegen die Sorption von Phenol und 2,4-DCP an Sediment-Fractionen in einem Bioreaktor, wobei das 2,4-DCP, übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen für den Versuchsboden, stärker als Phenol an diesen sorbierte.

Die Sorption organischer Schadstoffe ist ein komplexer Prozess, bei dem neben den Schadstoff-Eigenschaften auch die Zusammensetzung und Eigenschaften der Böden selbst eine wichtige Rolle spielen (Delle Site 2001). Vor allem der Gehalt an organischer Bodensubstanz ist dabei von besonderer Bedeutung, denn bereits geringe Gehalte können den Einfluss mineralischer Sorbenten „maskieren“ (Blume *et al.* 2010). Damit übereinstimmend zeigten die eigenen Analysen, dass sowohl die Sorption des Phenols, als auch die des 2,4-DCP durch den organischen Kohlenstoffgehalt in den drei untersuchten Bodenvarianten beeinflusst wurden. Der Zusammenhang zwischen der Sorption und dem C_{org} -Gehalt war beim 2,4-DCP jedoch stärker und andersartig ausgeprägt als beim Phenol. So korrelierten die sorbierten 2,4-DCP-Mengen und die Verteilungskoeffizienten bei allen fünf untersuchten Konzentrationen eindeutig positiv mit dem C_{org} -Gehalt der drei Bodenvarianten. Beim Phenol war eine Korrelation der sorbierten Mengen bzw. des Verteilungskoeffizienten mit dem C_{org} -Gehalt dagegen nur bei drei Konzentrationen (0,001, 0,01 und 0,1 mM) zu erkennen, nicht jedoch darüber. So waren bei den höheren Phenol-Konzentrationen, 1 und 10 mM, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten NIL, NPK und FYM festzustellen, woraus zu folgern ist, dass die Sorption des Phenols hier nicht durch die C_{org} -Gehalte beeinflusst wurde.

Die quantitativen Unterschiede der sorbierten 2,4-DCP-Mengen zwischen der NPK- und FYM-Variante der nicht-fraktionierten Böden waren deutlich auf den organischen Kohlenstoffgehalt zurückführen. Dies zeigte sich an den K_{oc} -Werten, die bei einer gleichen Ausgangskonzentration übereinstimmten. Die K_{oc} -Werte der Variante NIL waren dagegen immer niedriger als die der beiden anderen Bodenvarianten. Diese Abweichung ist möglicherweise mit qualitativen Unterschieden in der C_{org} -Zusammensetzung zwischen NIL und NPK bzw. FYM zu erklären, denn die Aufnahmekapazität für organische Verbindungen hängt nicht nur von der Quantität sondern auch von der Qualität der organischen Substanz ab (Benoit *et al.* 1996). Andererseits ist auch bekannt, dass neutrale und anionische Formen von organischen Schadstoffen unterschiedlich stark an die organische Substanz sorbieren (Hyun & Lee 2004). Da der pH-Wert der NIL Böden mit 7,0 im Vergleich zu 6,3 bei NPK/FYM (vgl. Tab. 31) relativ nah am pK_s -Wert von 2,4-DCP (7,97) lag, war bei diesen unter den Versuchsbedingungen ein größerer Anteil des 2,4-DCP dissoziiert. Da die anionische Form des 2,4-DCP hydrophiler als die neutrale Form ist, könnte dies zu einer Abnahme der sorbierten Schadstoffmengen an der NIL-Variante geführt haben. Dies würde die niedrigeren K_{oc} -Werte für diese Bodenvariante ebenfalls erklären. Ein Zusammenhang zwischen steigenden pH-Werten und einer abnehmenden Sorption von 2,4-DCP wurde bereits bei andersartigen, Allophan-haltigen Böden nachgewiesen (Cea *et al.* 2007).

Die K_{oc} -Werte für die Sorption von Phenol deuteten nur bei der Konzentration von 0,1 mM auf einen Einfluss des C_{org} hin. Nach Berücksichtigung der Kohlenstoffgehalte der Böden waren hier die für den Verteilungskoeffizienten ermittelten Unterschiede zwischen NIL und NPK/FYM nicht mehr signifikant. Im Gegensatz dazu blieben die Unterschiede zwischen den Bodenvarianten bei den Konzentrationen 0,001 und 0,01 mM auch bei den K_{oc} -Werten erhalten. Dies verdeutlichte die geringere Affinität des Phenols zur organischen Bodensubstanz und zeigte, dass bei der Sorption dieser Verbindung offenbar weitere Bodeneigenschaften eine Rolle spielten. Möglicherweise sorbierte das Phenol mit zunehmenden Konzentrationen stärker an mineralische Bereiche der Bodenpartikel. Da sich die Zusammensetzung der mineralischen Bestandteile zwischen den Bodenvarianten nicht unterschied (Körschens & Pfefferkorn 1998), würde dies zu ähnlichen sorbierten Mengen, wie sie hier ermittelt wurden, führen. Im Gegensatz zum 2,4-DCP waren die Unterschiede zwischen NIL und den anderen beiden Bodenvarianten auch nicht mit den pH-Werten zu erklären, da das Phenol mit einem pK_s von 9,95 unter den Versuchsbedingungen vollständig undissoziiert vorliegt (Fiore & Zanetti 2009).

Die insgesamt an den Fraktionen sorbierten Phenol- bzw. 2,4-DCP-Mengen waren immer niedriger als die an den nicht-fraktionierten Böden. Dies war durch eine Desorption der an den Partikeln gebundenen Schadstoffe während der Korngrößenfraktionierung zu erklären. Damit übereinstimmend wurden nach der Aufarbeitung tatsächlich bis zu 67 % (Phenol) bzw. 70 % (2,4-DCP) der zugegebenen Schadstoffmengen im Waschwasser nachgewiesen (Finke 2009, Köhler 2010). Bei einer gleichen Ausgangskonzentration lagen die ermittelten Phenol- bzw. 2,4-DCP-Mengen im Waschwasser bei den drei untersuchten Bodenvarianten jedoch immer in einem ähnlichen Größenbereich. Daher waren die ermittelten Werte trotz

der Desorption dazu geeignet, die Verteilung der untersuchten Schadstoffe auf die unterschiedlichen Korngrößenfraktionen der Bodenvarianten NIL, NPK und FYM zu vergleichen. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass sich die von den Partikeln der vier untersuchten Fraktionen desorbierten Mengen voneinander unterscheiden könnten und die hier dargestellten Werte für die Korngrößenfraktionen daher nicht zwangsläufig die prozentuale Verteilung der Schadstoffe direkt nach dem Erreichen des Sorptionsgleichgewichts widerspiegeln.

Sowohl Phenol als auch 2,4-DCP zeigten eine deutlich ungleichmäßige Sorption an die verschiedenen Korngrößenfraktionen der Böden. Die Tonfraktion erwies sich für beide Verbindungen als stärkster Sorbent. Der prozentuale Anteil der Ton-gebundenen Schadstoffe betrug bei allen untersuchten Konzentrationen durchschnittlich 50 % der insgesamt wiedergefundenen Mengen. Der Anteil in den Schlufffraktionen (20-63 μm , 2-20 μm) und den Sandfraktionen (> 63 μm) war mit durchschnittlich 40 % bzw. 10 % dagegen deutlich niedriger. Eine ähnliche Verteilung auf Korngrößenfraktionen und eine hohe Anreicherung in der Tonfraktion wurde bereits für viele verschiedene Schadstoffe wie z. B. für Phenanthren gezeigt (Amellal *et al.* 2001, Uyttebroek *et al.* 2006). Diese bevorzugte Anreicherung von organischen Schadstoffen in den feineren Fraktionen ist in erster Linie auf die höheren organischen Kohlenstoffgehalte und die größeren Oberflächen der feinsten Partikel, mit denen sie in Wechselwirkung treten können, zurückführen (Christensen 2001). Dieser Zusammenhang konnte mit den eigenen Daten sowohl für Phenol, als auch für 2,4-DCP für alle drei Bodenvarianten bestätigt werden: so korrelierten die an den vier Korngrößen sorbierten Mengen bei den Konzentrationen 0,1 und 10 mM eindeutig positiv mit dem C_{org} und der Oberfläche der Partikelfraktionen (Tab. 52). Eine Ausnahme bildete dabei jedoch die FYM-Variante beim 2,4-DCP. Bei einer Konzentration von 0,1 mM war der lineare Zusammenhang zwischen den Größen deutlich schwächer ausgeprägt und bei 10 mM war keine Korrelation mehr zu erkennen. Dies lässt sich vermutlich mit den hohen 2,4-DCP-Gehalten in der > 63 μm -Fraktion dieser Bodenvariante erklären (s. u.).

Die Bodenvariante bzw. der damit verbundene organische Kohlenstoffgehalt wirkte sich bei beiden Schadstoffen positiv auf die Sorption an die gröberen Fraktionen (> 63 μm , 20-63 μm) aus. Sowohl bei Phenol als auch bei 2,4-DCP nahmen die sorbierten Mengen dabei mit steigenden organischen Kohlenstoffgehalten zu. Besonders deutlich zeigte sich dies für das 2,4-DCP bei den > 63 μm Fraktionen (vgl. Abb. 43). Der prozentuale Anteil des Schadstoffs in dieser Fraktion erhöhte sich zudem in Abhängigkeit von der Konzentration (vgl. Abb. 44). Dies zeigte, dass bei einem Überschuss an 2,4-DCP die > 63 μm Fraktion bzw. die vermehrt darin enthaltenen pflanzlichen Rückstände bei den Varianten NPK und FYM für die Sorption an Bedeutung gewannen. Die Zunahme des Phenols an dieser Fraktion war dagegen niedriger, was sich durch die bereits erwähnte stärkere Lipophilie des 2,4-DCP im Vergleich zu Phenol erklären ließ.

4.6 Abbau von Phenol in den Bodenvarianten

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bodenproben, unabhängig von der Bodenvariante, wiesen ein hohes natürliches Abbaupotenzial für Phenol auf. Dies zeigte sich darin, dass die Mineralisierung der Verbindung, wie sie über die Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ verfolgt wurde, bereits nach wenigen Stunden in allen Varianten begann. Die höchsten maximalen Abbauraten wurden in allen Fällen bereits nach zwei bis drei Tagen erreicht und nach sechs Tagen fand bis zum Versuchsende nach 15 Tagen keine signifikante CO_2 -Freisetzung aus Phenol mehr statt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden 24 bis 28 % des zugesetzten ^{14}C -Phenols zu CO_2 umgesetzt. Eine sehr ähnliche Phenol-Mineralisierungsrate mit 23 % nach zwei Tagen und 34 % nach 14 Tagen wurde zuvor über $^{13}\text{CO}_2$ -Messungen schon für einen schluffigen Lehm Boden ermittelt, bei denen allerdings eine höhere Ausgangskonzentration (15 mM) eingesetzt wurde (Padmanabhan *et al.* 2003). In den eigenen Analysen konnte durch Bestimmung der ^{14}C -Aktivität in den Böden gezeigt werden, dass ein Großteil der Kohlenstoffatome des Phenols in den Böden verblieb, also nicht sofort mineralisiert wurde. Weitere Untersuchungen zur Identität des Boden-gebundenen ^{14}C aus dem Phenol zeigten für alle drei Bodenvarianten, dass ca. 2 % der Ausgangsaktivität zum Versuchsende in die mikrobielle Biomasse eingebaut wurden. Dies zeigte, dass offensichtlich in allen drei Bodenvarianten Mikroorganismen das Phenol direkt oder indirekt als C-Quelle verwerten konnten. Der etwas niedrigere Gesamtabbau von Phenol bei der FYM-Variante deutete auf eine eingeschränkte Verfügbarkeit für die abbauenden Mikroorganismen im Vergleich zu den beiden anderen Bodenvarianten hin. Offensichtlich hatte die höhere Biomasse in der FYM-Variante keinen förderlichen Einfluss auf die Phenol-Abbauleistung.

Die SIP-Ergebnisse zeigten, dass die ähnlichen Abbaukurven, Mineralisierungsraten und der vergleichbare Einbau in die mikrobielle Biomasse bei den unterschiedlichen Bodenvarianten auf der Beteiligung der gleichen am Phenol-Abbau beteiligten dominanten Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) beruhten. Die dominanten Phenol-verstoffwechselnden Bakterien in den Bodenvarianten wurden über phylogenetische Analysen der 16S rRNA-Gen Partialsequenzen dabei als *Arthrobacter* und *Rhodococcus* aus dem Phylum der Actinobacteria identifiziert. Beide Arten gehören zu den am häufigsten und weltweit ubiquitär aus Boden isolierbaren Bakterien (Larkin *et al.* 2005, Jones & Keddle 2006). Sie zeichnen sich insgesamt durch eine hohe Vielfalt an Stoffwechselleistungen aus (Hagedorn & Holt 1975, Finnerty 1992,) und einige besitzen die Fähigkeit zum aeroben Abbau von Phenol (Vijayaraghavan *et al.* 1995, Margesin *et al.* 2005). In den eigenen Untersuchungen konnte mit SIP darüber hinaus gezeigt werden, dass auch Pilze am Phenol-Abbau in den Versuchsböden beteiligt waren. Den größten Anteil an diesem Umsetzungsprozess hatte dabei ein Pilz aus der Gattung *Cryptococcus*, der bei allen Bodenvarianten eine hohe Abundanz sowohl auf den SSCP-Profilen als auch in den Klonbibliotheken (≥ 96 % der Klone) aufwies. Bei Vertretern dieser Gattung handelt es sich um Hefen aus dem Phylum der Basidiomycota. Tatsächlich wurde die Fähigkeit zum Phenol-Abbau bei Pilzen relativ häufig bei Hefen oder Hefe-artig wachsenden Stämmen beschrieben (Margesin *et al.* 2005, Agarry

et al. 2008, DeRito & Madsen 2009). Die allgemeine ökologische Funktion in Böden ist bei *Cryptococcus*-Arten bisher nicht bekannt (Nishizawa *et al.* 2010). Jedoch bilden Phenole wichtige Strukturelemente im Lignin. Da Pilze aus Böden häufig am Ab- und Umbau von Lignin beteiligt sind, ist es daher nicht überraschend, dass einige die Fähigkeit zum Wachstum mit Phenol besitzen. Ein aerober Phenol-Abbau, wie er unter den Versuchsbedingungen zu erwarten wäre, wurde zuvor schon über Anreicherungskulturen für *Cryptococcus*-Arten beschrieben (Bergauer *et al.* 2005, Mörsen & Rehm 1990). Die Ergebnisse dieser Arbeit beweisen erstmals, dass *Cryptococcus*-Vertreter tatsächlich *in situ* Phenol abbauen.

Der Anteil der am Phenol-Abbau beteiligten *Arthrobacter* nahm mit steigendem C_{org}-Gehalt in den Bodenvarianten (NIL > NPK > FYM) ab. Diesen Hinweis gab es auf den SSCP-Gelen durch unterschiedliche Bandenintensitäten (vgl. Abb. 51) und dieser Unterschied konnte durch unabhängig erstellte Klon-Bibliotheken (vgl. Abb. 54) bestätigt werden. Dieser quantitative Unterschied zwischen den Bodenvarianten unterstreicht am Beispiel des Phenol-Abbaus die Bedeutung der organischen Bodensubstanz für die funktionelle Diversität der Bakterien. Im Gegensatz zur Reaktion von *Arthrobacter*, wurde der Anteil der am Phenol-Abbau beteiligten *Rhodococcus* offenbar positiv durch die unterschiedlichen organischen Kohlenstoffgehalte beeinflusst. Zwar waren zwischen NIL und NPK keine Unterschiede zu erkennen, jedoch wies die FYM-Variante sowohl eine stärkere Bandenintensität als auch einen höheren Anteil von *Rhodococcus*-Sequenzen in der Klon-Bibliothek auf. Die Unterschiede zwischen der Reaktion von *Arthrobacter* und *Rhodococcus* weisen darauf hin, dass sie unterschiedliche Nischen im heterogenen Lebensraum "Boden" besiedeln. Möglicherweise kann auch das Phenol in den Varianten NPK und FYM „schneller“ von *Rhodococcus* sp. umgesetzt werden, wenn weniger Vertreter der *Arthrobacter* sp. mit ihnen um das Substrat konkurrieren. Die am Phenol-Abbau in den Bodenvarianten des Versuchs beteiligten Pilze, d. h. *Cryptococcus*-Verwandte, wurden in ihrer Abundanz dagegen nicht durch den organischen Kohlenstoff beeinflusst. Tatsächlich ergaben sich, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, Hinweise auf eine Assoziation der pilzlichen Abbauer mit der Feinschlufffraktion (2-20 µm), bei der die Unterschiede im C_{org}-Gehalt zwischen den Bodenvarianten nicht so stark ausgeprägt waren wie in den gröberkörnigen Fraktionen (vgl. Tab. 51).

Durch die Korngrößenfraktionierung in Verbindung mit der SIP-Technik konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der mikrobielle Phenol-Abbau an den feineren Fraktionen (< 20 µm) stattfand. Die Phenol-abbauenden Bakterien waren vor allem in der Tonfraktion lokalisiert, was anhand der SSCP-Profile für die NIL- und NPK-Variante deutlich wurde. Dies entsprach den Erwartungen, da die Phenol-Gehalte in dieser Fraktion am höchsten waren und sich dort ein Großteil der Bakterien, wie zuvor mit der quantitativen PCR nachgewiesen wurde, befand. Die aktiv Phenol-abbauenden Pilze lagen dagegen vor allem in der Feinschlufffraktion (2-20 µm) vor. Da *Cryptococcus* Arten meist nicht filamentös wachsen, konnten diese Pilze offenbar Nischen, die besonders durch diese Fraktion im Boden gebildet werden, besiedeln. Dieses Ergebnis stützt auch die zuvor getroffene

Annahme (vgl. 4.3), dass sich möglicherweise vor allem einzellig lebende Pilz-Arten in dieser Fraktion befanden. Da sie an unterschiedlichen Partikelgrößen vorlagen, standen die Phenol-abbauenden Bakterien und Pilze vermutlich nicht in direkter Konkurrenz um ihr Substrat.

4.7 Abbau von 2,4-DCP in den Bodenvarianten

Im Gegensatz zu Phenol wurde 2,4-DCP nur in den gedüngten Bodenvarianten NPK und FYM mikrobiell abgebaut. Eine Mineralisierung setzte in diesen Varianten nach etwa sechs bis sieben Tagen ein, bei NIL wurde auch nach 21 Tagen kein Abbau verzeichnet. Diese Verzögerung im FYM-Boden um einen Tag im Vergleich zu NPK deutete daraufhin, dass zunächst eine Anreicherung der Abbauer stattfand. Sowohl die maximale Abbaurrate, die Gesamtabbaurrate und das in der Biomasse eingebaute ^{14}C waren bei der Variante NPK deutlich höher als bei FYM. Der sehr unterschiedliche 2,4-DCP-Abbau in den Bodenvarianten ließ sich jedoch nicht allein mit einer unterschiedlichen Bioverfügbarkeit des Schadstoffs erklären. Die Sorption des 2,4-DCP an den drei Bodenvarianten war zwar unterschiedlich, jedoch lagen die Werte für die Variante NPK, bei der die stärkste Mineralisierung auftrat, immer zwischen denen der beiden anderen Varianten. Die Unterschiede zwischen NPK und FYM und der vollständig fehlende Abbau bei NIL deuten daher auf ein voneinander abweichendes Abbaupotenzial der in diesen Böden vorliegenden Mikroorganismen-Gemeinschaften hin.

Damit übereinstimmend zeigten die SIP-Analysen, dass der 2,4-DCP-Abbau in den Bodenvarianten NPK und FYM auf unterschiedliche Bakterien-Arten als Hauptabbauer zurückzuführen war. Die 2,4-DCP mineralisierenden Bakterien dieser Untersuchung stammten beide aus der Klasse der *Betaproteobacteria*, bei denen die Fähigkeit zum 2,4-DCP Abbau zuvor bereits beschrieben wurde (Cupples & Sims 2007, Lillis *et al.* 2009). Im NPK-Boden waren Vertreter der *Burkholderia*, einer im Boden häufig vorkommenden Gattung, für den 2,4-DCP-Abbau verantwortlich. Einige *Burkholderia*-Arten können eine große Bandbreite an organischen Verbindungen als Nahrungsquelle verwerten, weswegen sie bei der biologischen Sanierung von kontaminierten Böden eingesetzt werden (Surridge *et al.* 2009). Die Verstoffwechslung von 2,4-DCP durch Vertreter dieser Gattung wurde schon früher nachgewiesen (Shaw *et al.* 1999, 2002). Im FYM-Boden wurde das 2,4-DCP dagegen von einem Vertreter aus der Gattung *Variovorax* abgebaut. Ähnlich wie die *Burkholderia* sp. liegen *Variovorax*-Arten ubiquitär in Böden vor und zeichnen sich durch eine hohe Stoffwechselvielfalt aus (Jamieson *et al.* 2009). Auch ein Abbau von 2,4-DCP durch Stämme aus dieser Gattung ist bekannt (Vallaey *et al.* 1999).

Der 2,4-DCP-Abbau durch *Burkholderia* sp. im NPK-Boden erfolgte mit einer höheren maximalen Verstoffwechslungs- und Gesamtabbaurrate, als der durch *Variovorax* sp. im FYM-Boden. Dies könnte durch die stärkere Sorption des 2,4-DCP an den FYM-Böden und der damit verbundenen geringeren Verfügbarkeit als Substrat für die 2,4-DCP-abbauenden

Bakterien hervorgerufen worden sein. Eine weitere Erklärung hierfür wäre eine höhere Anzahl an 2,4-DCP-Abbauern in den NPK-Böden. Diese Erklärung wird dadurch gestützt, dass tatsächlich zwei unterschiedliche Banden auf den NPK-SSCP-Profilen *Burkholderia* repräsentierten, während bei der Variante FYM nur eine einzelne Bande (*Variovorax*) vorlag. Auch der für die ermittelten *Burkholderia*-Sequenzen erstellte phylogenetische Baum könnte auf zwei unterschiedliche Arten im Boden hinweisen (vgl. Abb. 64). Tatsächlich unterschieden sich die *Burkholderia*-Sequenzen in dem amplifizierten DNA-Abschnitt in sieben Nukleotiden, was deutlich über der Operonheterogenität von ein bzw. drei Nukleotiden lag, wie sie von Coenye & Vandamme (2003) zuvor für das gesamte 16S rRNA-Gen anhand zweier repräsentativer Vertreter der *Burkholderia* ermittelt wurde. Das Vorliegen von zwei 2,4-DCP-Abbauern könnte die höhere $^{14}\text{CO}_2$ -Mineralisierungsrate und die im Vergleich zur FYM-Variante fast doppelt so hohe ^{14}C -Aktivität in der mikrobiellen Biomasse bei der NPK-Variante erklären.

Ein Abbau des Schadstoffs durch Pilze konnte über die SIP-Technik nicht nachgewiesen werden, obwohl in anderen Untersuchungen bereits einige Pilz-Stämme beschrieben wurden, die diese Fähigkeit besitzen (Nakagawa *et al.* 2006, Field & Sierra-Alvarez 2008). Eine Erklärung hierfür könnte neben dem Fehlen dieser Arten in den untersuchten Bodenvarianten auch die Degradation des 2,4-DCP in Form eines Cometabolismus darstellen. Bei dieser Art des Abbaus würde der Schadstoff in Gegenwart eines zweiten Stoffs zwar oxidiert werden, jedoch könnten die Pilze keine Energie aus diesem Prozess für ihr Wachstum ziehen (Alexander 1981) und auch keinen Kohlenstoff aus dem 2,4-DCP in die Biomasse einbauen. Ein solcher cometabolischer Abbau ist über die SIP-Technik nicht nachzuweisen.

Interessanterweise spielten die zuvor am Phenol-Abbau beteiligten Actinobakterien keine erkennbare Rolle beim Abbau des 2,4-DCP. Dies deutete darauf hin, dass in den Böden unter den Versuchsbedingungen in erster Linie ein aerober Abbau dieses Schadstoffs stattfand, Beim anaeroben Abbau würde dagegen Phenol als Zwischenprodukt entstehen (Field & Sierra-Alvarez 2008), wodurch sich vermutlich Phenol-Abbauer angereichert hätten.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der organischen Bodensubstanz und unterschiedlicher Korngrößenfraktionen auf die Abundanz und Vielfalt der im Boden lebenden Mikroorganismen, die Verteilung von zugesetzten organischen Schadstoffen und deren mikrobiellen Abbau in Langzeit-Düngungsvarianten eines landwirtschaftlichen Bodens charakterisiert.

Verglichen wurden drei Varianten einer Löß-Schwarzerde, die seit mehr als 100 Jahren einer kontinuierlichen, unterschiedlichen Düngungspraxis unterworfen waren, wodurch sich unterschiedliche, stabile organische Kohlenstoffgehalte (C_{org}) eingestellt hatten. Zur Auftrennung des Bodens in die vier typischen Partikelgrößen Sand (mit partikulärer organischer Substanz), Grobschluff, Feinschluff und Ton wurde eine auf Ultrabeschallung, Feuchtsiebung, Zentrifugation und Sedimentation basierende Technik angewendet. Diese wurde gegenüber einem bereits etablierten Verfahren so modifiziert, dass mikrobielle Biomasse und DNA in den Fraktionen nahezu vollständig im Vergleich zu den nicht-fraktionierten Bodenproben erhalten blieben.

Zur Charakterisierung der Mikroorganismen-Gemeinschaften wurden spezifisch die Populationsgrößen und die Diversität der *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi* über kultivierungsunabhängige molekularbiologische Methoden quantitativ mit der qPCR und in ihrer Vielfalt mit der T-RFLP Technik auf Grundlage von PCR amplifizierten Genen der kleinen ribosomalen Untereinheiten (SSU rRNA-Gene) bestimmt.

Anhand der DNA-Gehalte und über qPCR konnte nachgewiesen werden, dass sich die mikrobielle Biomasse in Folge der unterschiedlichen Langzeitdüngungen in den Bodenvarianten erhöhte und dabei mit den ebenfalls ansteigenden C_{org} -Gehalten eng korrelierte. Dieser Anstieg war auf einer Zunahme der Bakterien, Archaeen und Pilze zurückzuführen. Die Analyse der Korngrößenfraktionen zeigte, dass sich die Populationsgrößen jedoch allein in den gröberen Fraktionen, d. h. den Sand- und Schluff-Fraktionen veränderten, während die in der Tonfraktion unbeeinflusst blieben.

Die T-RFLP Ergebnisse zeigten, dass auch die Vielfalt der Bakterien, Archaeen und Pilze durch die C_{org} -Gehalte beeinflusst wurden. Die Vielfalt der Bakterien-Gemeinschaften zeigte bei den verschiedenen Korngrößenfraktionen große Unterschiede, wobei die gröberen Fraktionen (Sand, Grobschluff) im Gegensatz zum Feinschluff und Ton (feinere Fraktionen) auch eine eindeutige Abhängigkeit vom C_{org} -Gehalt der Bodenvarianten zeigten. Bei den Pilzen wirkte sich der C_{org} -Gehalt stärker auf die Vielfalt aus als die jeweiligen Korngrößen. Dies zeigte sich vor allem bei der am stärksten gedüngten Bodenvariante. Die Archaeen-Gemeinschaften wurden sowohl durch die C_{org} -Gehalte, als auch die Korngröße geprägt.

Das Schicksal von organischen Schadstoffen in den Böden wurde anhand von zwei mikrobiell abbaubaren Modellsubstanzen (Phenol und 2,4-Dichlorphenol, 2,4-DCP), untersucht. Ihr

konzentrationsabhängiges Sorptionsverhalten und ihre Verteilung auf die Korngrößenfraktionen wurden mit Hilfe der jeweiligen ^{14}C -markierten Verbindungen ermittelt. Es zeigte sich, dass 2,4-DCP eine höhere und Phenol eine niedrigere Affinität zur Bindung an die organische Substanz aufwies. So nahmen die an Bodenpartikeln sorbierten 2,4-DCP-Mengen unabhängig von der zugegebenen Ausgangskonzentration bei den Bodenvarianten mit höheren C_{org} -Gehalten zu. Im Gegensatz dazu verblieb das Phenol bei den stärker gedüngten Bodenvarianten zu einem größeren Anteil in der wässrigen Boden-Lösung. Das unterschiedliche Sorptionsverhalten wurde durch die Analyse der Korngrößenfraktionen bestätigt.

Der mikrobielle Abbau der beiden Schadstoffe wurde in Inkubationsexperimenten mit den ^{14}C -markierten Substanzen über deren $^{14}\text{CO}_2$ -Mineralisierungsrate verfolgt. Anhand der Abbaukurven aus diesen Versuchen wurden Bodeninkubationen mit ^{13}C -Markierung unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, um die am Abbau beteiligten Mikroorganismen über SIP (*stable isotope probing*), PCR-Amplifikation von SSU rRNA Genen kombiniert mit SSCP-Fingerprinting und DNA-Sequenzierung zu charakterisieren. Der Phenol-Abbau verlief bei allen drei Bodenvarianten ähnlich mit vergleichbaren maximalen Abbauraten. In Abhängigkeit vom C_{org} -Gehalt waren jedoch auch quantitative Unterschiede zwischen den am Phenol-Abbau beteiligten Bakterien der drei Bodenvarianten zu erkennen. So nahm die Abundanz von Vertretern aus der Gattung *Arthrobacter* mit zunehmendem C_{org} ab, während *Rhodococcus* Vertreter positiv reagierten. Auch Pilze waren, vor allem durch die Hefe *Cryptococcus*, die jedoch keine Unterschiede zwischen den Bodenvarianten aufwies, in den Böden am Phenol-Abbau beteiligt. Die Korngrößenfraktionierungen zeigten, dass sich die Phenol-abbauenden Bakterien vorwiegend in der Tonfraktion befanden, während *Cryptococcus* vor allem mit dem Feinschluff assoziiert war.

Der Abbau von 2,4-DCP fand nur in den beiden gedüngten Varianten statt, wobei sich die Abbauraten jedoch deutlich voneinander unterschieden. Die SIP-Ergebnisse zeigten, dass unterschiedliche Bakterien für den 2,4-DCP-Abbau in den beiden gedüngten Bodenvarianten verantwortlich waren. Im mineralisch gedüngten Boden waren dies Vertreter der *Burkholderia* während es im mineralisch-organisch gedüngten Boden Vertreter der *Variovorax* waren

Insgesamt belegen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass in Böden unterschiedliche Mikroorganismen-Gemeinschaften mit unterschiedlichen Partikelgrößen assoziiert sind und so Mikrokompimente (reaktive Oberflächen) existieren, an denen unterschiedliche Reaktionen auch im Hinblick auf den Abbau von Schadstoffen ablaufen. Diese Ergebnisse können einen Beitrag dazu leisten zukünftig genauer das Schicksal biologisch abbaubarer Verbindungen in unterschiedlichen Böden vorherzusagen und so zum nachhaltigen Schutz ihrer Funktionen beitragen.

Abstract

This study characterized the influence of soil organic matter and different particle size fractions on the abundance and diversity of soil microorganisms, the partitioning of applied organic pollutants and their microbial degradation in long-term fertilized variants of an agricultural soil.

Three variants of a haplic chernozem (Loess Black Earth) were compared to each other. These variants had been continuously differently fertilized for more than a hundred years, resulting in different but stable soil organic carbon contents (C_{org}). A wet sieving method based on sonication was applied for fractionating the soil variants into their four particle size classes, i. e. sand (including particulate organic matter), coarse silt, fine silt and clay, respectively. The method was successfully modified in comparison to a previous well-established protocol so that the microbial biomass and DNA could almost completely be sustained in comparison to the non fractionated soil variants.

For the characterization of the soil microbial community the specific population size and diversity of *Bacteria*, *Archaea* and *Fungi* were measured quantitatively by using qPCR and qualitatively using the T-RFLP technique. Both methods were based on the analysis of their respective PCR amplified ribosomal small subunit (SSU rRNA genes).

The qPCR results showed that different fertilization treatments resulted in an increase of the biomass in the soil variants. The biomass correlated with the C_{org} contents, which also increased in soil variants with higher fertilizer inputs. This increase could be attributed to an increase of the bacteria, archaea and fungi, respectively. Analysis of the particle size fractions revealed that the population sizes changed in coarser soil fractions, i. e. the sand and silt fractions, while the clay fraction was not influenced.

T-RFLP results demonstrated that the diversity of the bacteria, archaea and fungi were also influenced by the different C_{org} contents. The diversity of the bacteria populations showed high differences between particle size fractions. In contrast to the fine silt and clay fractions, the coarser fractions (sand, coarse silt) were also clearly influenced by the C_{org} contents of the soil variants. The diversity of the fungi was influenced to a greater extent by C_{org} contents than by particle size. This was mainly seen for the soil variant with the highest fertilizer input. The archaea communities were influenced by both the C_{org} content and the particle size.

The fate of organic pollutants in soil was analyzed using two microbial degradable model substances (phenol and 2,4-dichlorophenol, 2,4-DCP). Their concentration-dependent sorption behaviour and their partitioning to the particle size fractions were followed using the corresponding ^{14}C -labeled compounds. It could be shown that 2,4-DCP had a higher affinity for sorption to soil organic matter than phenol. Sorption of the 2,4-DCP amounts correlated with higher C_{org} contents independent from the added pollutant

concentrations. In contrast, phenol remained to a greater extent in the soil solution in these higher C_{org} soil variants. The different sorption behaviour could be confirmed by analyzing the particle size fractions.

The microbial degradation was analyzed in incubation experiments with the ^{14}C -labeled compounds following their $^{14}CO_2$ production rate. Based on the degradation curves from these experiments soil incubations under the same conditions, but with the ^{13}C -labeled compounds, were performed for characterizing the microorganisms degrading the pollutants. To achieve this, SIP (*stable isotope probing*), PCR amplification of SSU rRNA genes in combination with SSCP fingerprinting and DNA sequencing was applied. Phenol degradation was similar in all soil variants with comparable maximum degradation rates. However, C_{org} dependent quantitative differences between the phenol-degrading bacteria in the three soil variants were observed. The abundance of representatives of the genus *Arthrobacter* decreased with higher C_{org} levels, while representatives of the genus *Rhodococcus* were positively influenced. Also fungi, mainly represented by the yeast *Cryptococcus*, took part in the phenol degradation in the soils. Their abundance did not differ between the soil variants. Particle size fractionation revealed that the phenol-degrading bacteria were mainly associated with clay, while *Cryptococcus* was predominant in the fine silt fraction.

Degradation of 2,4-DCP was only observed in the two soil variants with fertilizer treatment, but the degradation rates were clearly different. SIP results showed that different bacteria were responsible for degradation in these soil variants. In the soil variant with mineral fertilization these were representatives of the genus *Burkholderia*, in the soil variants with organo-mineral treatment representatives of *Variovorax*.

In conclusion, the results of this work verify that different soil microbial communities are associated with different particle size fractions, leading to the existence of micro-compartments (reactive surfaces). At these sites different reactions, also in regard to the degradation of pollutants, can occur. Therefore these results can contribute to predicting the fate of biological degradable pollutants in different soils, and thereby can help to develop strategies for a sustainable protection of soil functions in the future.

6. Literaturverzeichnis

Agarry, S. E., Durojaiye, A. O. & Solomon, B. O. 2008. Microbial degradation of phenols: a review. *International Journal of Environment and Pollution*, **32**, 12-28.

Ahel, M., Hršak, D. & Giger, W. 1994. Aerobic transformation of short-chain alkylphenol polyethoxylates by mixed bacterial cultures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **26**, 540-548.

Ahmed, M. & Oades, J. M. 1984. Distribution of organic matter and adenosine triphosphate after fractionation of soils by physical procedures. *Soil Biology and Biochemistry*, **16**, 465-470.

Alexander, M. 1981. Biodegradation of Chemicals of Environmental Concern. *Science*, **211**, 132-138.

Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology*, **34**, 4259-4265.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403-410.

Amato, M. & Ladd, J. N. 1992. Decomposition of C-14-Labeled Glucose and Legume Material in Soils - Properties Influencing the Accumulation of Organic Residue-C and Microbial Biomass-C. *Soil Biology & Biochemistry*, **24**, 455-464.

Amellal, N., Portal, J.-M. & Berthelin, J. 2001. Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. *Applied Geochemistry*, **16**, 1611-1619.

Amelung, W., Flach, K. W. & Zech, W. 1999. Lignin in particle-size fractions of native grassland soils as influenced by climate. *Soil Science Society of America Journal*, **63**, 1222-1228.

Amelung, W., Zech, W., Zhang, X., Follett, R. F., Tiessen, H., Knox, E. & Flach, K. W. 1998. Carbon, nitrogen, and sulfur pools in particle-size fractions as influenced by climate. *Soil Science Society of America Journal*, **62**, 172-181.

Anderson, J. P. E. & Domsch, K. H. 1978. Mineralization of Bacteria and Fungi in Chloroform-Fumigated Soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **10**, 207-213.

Ashelford, K. E., Chuzhanova, N. A., Fry, J. C., Jones, A. J. & Weightman, A. J. 2005. At Least 1 in 20 16S rRNA Sequence Records Currently Held in Public Repositories Is Estimated To Contain Substantial Anomalies. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 7724-7736.

Auguet, J. C., Barberan, A. & Casamayor, E. O. 2010. Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME Journal*, **4**, 182-190.

- Babich, H., Stotzky, G. & Ehrlich, H. L. 1980. Environmental Factors that Influence the Toxicity of Heavy Metal and Gaseous Pollutants to Microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, **8**, 99-145.
- Baker, G. C., Smith, J. J. & Cowan, D. A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, **55**, 541-555.
- Barthés, B. & Roose, E. 2002. Aggregate stability as an indicator of soil susceptibility to runoff and erosion; validation at several levels. *CATENA*, **47**, 133-149.
- Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G. & Gresshoff, P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **196**, 80-83.
- Bates, S. T., Berg-Lyons, D., Caporaso, J. G., Walters, W. A., Knight, R. & Fierer, N. 2010. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME Journal*, **5**, 908-917 .
- Bending, G. D., Friloux, M. & Walker, A. 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *Fems Microbiology Letters*, **212**, 59-63.
- Benoit, P., Barriuso, E., Houot, S. & Calvet, R. 1996. Influence of the nature of soil organic matter on the sorption-desorption of 4-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol and the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *European Journal of Soil Science*, **47**, 567-578.
- Bergauer, P., Fonteyne, P. A., Nolard, N., Schinner, F. & Margesin, R. 2005. Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere*, **59**, 909-918.
- Blackwood, C. B., Oaks, A. & Buyer, J. S. 2005. Phylum- and Class-Specific PCR Primers for General Microbial Community Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 6193-6198.
- Blair, N., Faulkner, R. D., Till, A. R., Korschens, M. & Schulz, E. 2006. Long-term management impacts on soil C, N and physical fertility: Part II: Bad Lauchstadt static and extreme FYM experiments. *Soil and Tillage Research*, **91**, 39-47.
- Blume, H. P., Brümmer, G. W., Horn, R., Kandeler, E., Kögel-Knabner, I., Kretzschmar, R., Stahr, K., Wilke, B. M., Thiele-Bruhn, S. & Welp, G. 2010. *Scheffer/Schachtschabel Lehrbuch der Bodenkunde*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Böhme, L., Langer, U. & Böhme, F. 2005. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **109**, 141-152.

- Borodina, E., Cox, M. J., McDonald, I. R. & Murrell, J. C. 2005. Use of DNA-stable isotope probing and functional gene probes to investigate the diversity of methyl chloride-utilizing bacteria in soil. *Environmental Microbiology*, **7**, 1318-1328.
- Boyd, S. A. 1982. Adsorption of Substituted Phenols By Soil. *Soil Science*, **134**.
- Brochier, C. & Philippe, H. 2002. Phylogeny: A non-hyperthermophilic ancestor for Bacteria. *Nature*, **417**, 244.
- Bru, D., Martin-Laurent, F. & Philippot, L. 2008. Quantification of the Detrimental Effect of a Single Primer-Template Mismatch by Real-Time PCR Using the 16S rRNA Gene as an Example. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 1660-1663.
- Bryant, D., Galtier, N. & Poursat, M. A. 2005. Likelihood Calculation in Molecular Phylogenetics. (ed O.Gascuel), pp. 1-32. Oxford University Press.
- Buckley, D. H. & Schmidt, T. M. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology*, **5**, 441-452.
- Burggraf, S., Huber, H. & Stetter, K. O. 1997. Reclassification of the Crenarchaeal Orders and Families in Accordance with 16S rRNA Sequence Data. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**, 657-660.
- Buyanovsky, G. A., Aslam, M. & Wagner, G. H. 1994. Carbon Turnover in Soil Physical Fractions. *Soil Science Society of America Journal*, **58**, 1167-1173.
- Calabrese, E. J. & Kenyon, E. M. 1991. *Air toxics and risk assessment*. Lewis Publishers.
- Cambardella, C. A. & Elliott, E. T. 1994. Carbon and Nitrogen Dynamics of Soil Organic-Matter Fractions from Cultivated Grassland Soils. *Soil Science Society of America Journal*, **58**, 123-130.
- Carter, D. L., Heilman, M. D. & Gonzales, C. L. 1965. Ethylene Glycol Monoethyl Ether for Determining Surface Area of Silicate Minerals. *Soil Science*, **100**, 356-360.
- Cea, M., Seaman, J. C., Jara, A. A., Fuentes, B., Mora, M. L. & Diez, M. C. 2007. Adsorption behavior of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol in an allophanic soil. *Chemosphere*, **67**, 1354-1360.
- Chefetz, B., Tarchitzky, J., Deshmukh, A. P., Hatcher, P. G. & Chen, Y. 2002. Structural characterization of soil organic matter and humic acids in particle-size fractions of an agricultural soil. *Soil Science Society of America Journal*, **66**, 129-141.
- Chiou, C. T., Peters, L. J. & Freed, V. H. 1979. Physical Concept of Soil-Water Equilibria for Non-Ionic Organic-Compounds. *Science*, **206**, 831-832.

- Chiou, C. T., Peters, L. J. & Freed, V. H. 1981. Soil-Water Equilibria for Non-Ionic Organic-Compounds. *Science*, **213**, 684.
- Chiu, C. Y., Chen, T. H., Imberger, K. & Tian, G. 2006. Particle size fractionation of fungal and bacterial biomass in subalpine grassland and forest soils. *Geoderma*, **130**, 265-271.
- Chotte, J. L., Ladd, J. N. & Amato, M. 1998. Sites of microbial assimilation, and turnover of soluble and particulate C-14-labelled substrates decomposing in a clay soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **30**, 205-218.
- Christensen, B. T. 1992. Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. *Advances in Soil Science*, **20**, 1-90.
- Christensen, B. T. 2001. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *European Journal of Soil Science*, **52**, 345-353.
- Chung, N. & Alexander, M. 1998. Differences in Sequestration and Bioavailability of Organic Compounds Aged in Dissimilar Soils. *Environmental Science & Technology*, **32**, 855-860.
- Chung, N. & Alexander, M. 2002. Effect of soil properties on bioavailability and extractability of phenanthrene and atrazine sequestered in soil. *Chemosphere*, **48**, 109-115.
- Coenye, T. & Vandamme, P. 2003. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *Fems Microbiology Letters*, **228**, 45-49.
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M. & Tiedje, J. M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, **37**, D141-D145.
- Copley, Shelley D. Diverse mechanistic approaches to difficult chemical transformations: microbial dehalogenation of chlorinated aromatic compounds. *Chemistry & biology* **4**[3], 169-174. 1-3-1997.
- Crow, S. E., Swanston, C. W., Lajtha, K., Brooks, J. R. & Keirstead, H. 2007. Density fractionation of forest soils: methodological questions and interpretation of incubation results and turnover time in an ecosystem context. *Biogeochemistry*, **85**, 69-90.
- Cupples, A. M. & Sims, G. K. 2007. Identification of in situ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading soil microorganisms using DNA-stable isotope probing. *Soil Biology & Biochemistry*, **39**, 232-238.
- Curtis, T. P. & Sloan, W. T. 2005. Exploring microbial diversity - A vast below. *Science*, **309**, 1331-1333.

- Curtis, T. P., Sloan, W. T. & Scannell, J. W. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 10494-10499.
- Czaplicka, M. 2004. Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment. *Science of the Total Environment*, **322**, 21-39.
- Degens, B. P. 1997. Macro-aggregation of soils by biological bonding and binding mechanisms and the factors affecting these: a review. *Soil Research*, **35**, 431-460.
- Delle Site, A. 2001. Factors Affecting Sorption of Organic Compounds in Natural Sorbent/Water Systems and Sorption Coefficients for Selected Pollutants. A Review. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **30**, 187.
- DeRito, C. & Madsen, E. 2009. Stable isotope probing reveals Trichosporon yeast to be active in situ in soil phenol metabolism. *ISME Journal*, **3**, 477-485.
- DeSantis, T. Z., Brodie, E. L., Moberg, J. P., Zubietta, I. X., Piceno, Y. M. & Andersen, G. L. 2007. High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. *Microbial Ecology*, **53**, 371-383.
- Dohrmann, A. B. & Tebbe, C. C. 2005. Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). In: Molecular microbial ecology manual (eds G.A.Kowalchuk *et al.*), pp. 809-838. Kluwer Academic Publications, Dordrecht; Boston; London.
- Dumont, M. G. & Murrell, J. C. 2005. Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 499-504.
- Escher, B. I., Snozzi, M., Häberli, K. & Schwarzenbach, R. P. 1997. A new method for simultaneous quantification of uncoupling and inhibitory activity of organic pollutants in energy-transducing membranes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 405-414.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*, **17**, 368-376.
- Field, J. & Sierra-Alvarez, R. 2008. Microbial degradation of chlorinated phenols. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **7**, 211-241.
- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R. & Jackson, R. B. 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 4117-4120.
- Fierer, N., Bradford, M. A. & Jackson, R. B. 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, **88**, 1354-1364.

- Finke, D. 2009. Verteilung von Phenol auf die Korngrößenfraktionen einer Schwarzerde. *Bachelorarbeit*, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Finnerty, W. R. 1992. The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annual Review of Microbiology*, **46**, 193-218.
- Fiore, S. & Zanetti, M. 2009. Sorption of phenols: influence of groundwater pH and of soil organic carbon content. *American Journal of Environmental Sciences*, **5**.
- Foster, R. C. 1988. Microenvironments of Soil-Microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, **6**, 189-203.
- Gadd, G. M. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, **111**, 3-49.
- Gallagher, E., McGuinness, L., Phelps, C., Young, L. Y. & Kerkhof, L. J. 2005. ¹³C-carrier DNA shortens the incubation time needed to detect benzoate-utilizing denitrifying bacteria by stable-isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 5192-5196.
- Ganley, A. R. D. & Kobayashi, T. 2007. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: Total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Research*.
- Gans, J., Wolinsky, M. & Dunbar, J. 2005. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. *Science*, **309**, 1387-1390.
- Gattinger, A., Hoefle, M. G., Schlöter, M., Embacher, A., Bohme, F., Munch, J. C. & Labrenz, M. 2007. Traditional cattle manure application determines abundance, diversity and activity of methanogenic Archaea in arable European soil. *Environmental Microbiology*, **9**, 612-624.
- Gevao, B., Semple, K. T. & Jones, K. C. 2000. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution*, **108**, 3-14.
- Golchin, A., Clarke, P., Oades, J. M. & Skjemstad, J. O. 1995. The effects of cultivation on the composition of organic-matter and structural stability of soils. *Soil Research*, **33**, 975-993.
- Gregorich, E. G., Kachanoski, R. G. & Voroney, R. P. 1989. Carbon Mineralization in Soil Size Fractions After Various Amounts of Aggregate Disruption. *Journal of Soil Science*, **40**, 649-659.
- Grosskopf, R., Stubner, S. & Liesack, W. 1998. Novel Euryarchaeotal Lineages Detected on Rice Roots and in the Anoxic Bulk Soil of Flooded Rice Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 4983-4989.

Guggenberger, G., Christensen, B. T. & Zech, W. 1994. Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soil: I. Lignin and carbohydrate signature. *European Journal of Soil Science*, **45**, 449-458.

Guggenberger, G., Elliott, E. T., Frey, S. D., Six, J. & Paustian, K. 1999. Microbial contributions to the aggregation of a cultivated grassland soil amended with starch. *Soil Biology & Biochemistry*, **31**, 407-419.

Gupta, V. V. S. R. & Germida, J. J. 1988. Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregate size classes as affected by cultivation. *Soil Biology and Biochemistry*, **20**, 777-786.

Hagedorn, C. & Holt, J. G. 1975. A nutritional and taxonomic survey of *Arthrobacter* soil isolates. *Canadian Journal of Microbiology*, **21**, 353-361.

Hallin, S., Jones, C. M., Schlöter, M. & Philippot, L. 2009. Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. *ISME Journal*, **3**, 597-605.

Hattori, T. 1988. Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. *Reports of the Institute for Agricultural Research, Tohoku University*, **37**.

Haugland, R. A., Heckman, J. L. & Wymer, L. J. 1999. Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. *Journal of Microbiological Methods*, **37**, 165-176.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. 1993. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature Biotechnology*, **11**, 1026-1030.

Hyun, S. & Lee, L. S. 2004. Hydrophilic and Hydrophobic Sorption of Organic Acids by Variable-Charge Soils: The Effect of Chemical Acidity and Acidic Functional Group. *Environmental Science & Technology*, **38**, 5413-5419.

Isaacson, P. J. & Frink, C. R. 1984. Nonreversible sorption of phenolic compounds by sediment fractions: the role of sediment organic matter. *Environmental Science & Technology*, **18**, 43-48.

Jamieson, W. D., Pehl, M., Gregory, G. & Orwin, P. 2009. Coordinated surface activities in *Variovorax paradoxus* EPS. *BMC Microbiology*, **9**, 124.

Janssen, P. H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 1719-1728.

Jenkinson, D. S. & Powlson, D. S. 1976. Effects of Biocidal Treatments on Metabolism in Soil-I. Fumigation with Chloroform. *Soil Biology & Biochemistry*, **8**, 167-177.

- Jia, Z. & Conrad, R. 2009. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, **11**, 1658-1671.
- Jones, D. & Keddle, R. M. 2006. The Genus *Arthrobacter*. In: The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community (eds M.Dworkin *et al.*), pp. 945-960. Springer, New York.
- Kahle, M., Kleber, M. & Jahn, R. 2002. Carbon storage in loess derived surface soils from Central Germany: Influence of mineral phase variables. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **165**, 141-149.
- Kahru, A., Maloverjan, A., Sillak, H. & Pöllumaa, L. 2002. The toxicity and fate of phenolic pollutants in the contaminated soils associated with the oil-shale industry. *Environmental Science and Pollution Research*, **9**, 27-33.
- Kanazawa, S. & Filip, Z. 1986. Distribution of microorganisms, total biomass, and enzyme activities in different particles of brown soil. *Microbial Ecology*, **12**, 205-215.
- Kandeler, E., Palli, S., Stemmer, M. & Gerzabek, M. H. 1999a. Tillage changes microbial biomass and enzyme activities in particle-size fractions of a Haplic Chernozem. *Soil Biology & Biochemistry*, **31**, 1253-1264.
- Kandeler, E., Tschirko, D., Bruce, K. D., Stemmer, M., Hobbs, P. J., Bardgett, R. D. & Amelung, W. 2000. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biology and Fertility of Soils*, **32**, 390-400.
- Kandeler, E., Stemmer, M. & Klomanek, E. M. 1999b. Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 261-273.
- Kemnitz, D., Kolb, S. & Conrad, R. 2007. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, **60**, 442-448.
- Killham, K., Amato, M. & Ladd, J. N. 1993. Effect of Substrate Location in Soil and Soil Pore-Water Regime on Carbon Turnover. *Soil Biology & Biochemistry*, **25**, 57-62.
- Kim, S. H. & Marsh, T. L. 2004. The analysis of microbial communities with terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). In: Molecular microbial ecology manual (ed G.A.Kowalchuk *et al.*), pp. 789-808. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, the Netherlands.
- Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R. & Schmidt, T. M. 2001. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research*, **29**, 181-184.
- Kögel-Knabner, I. 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*, **34**, 139-162.

- Köhler, A. 2010. Experimentelle Untersuchungen zur Sorption zweier phenolischer Verbindungen an Korngrößenfraktionen einer Schwarzerde mit unterschiedlichen organischen Kohlenstoffgehalten. *Diplomarbeit*, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Körschens, M., Merbach, I. & Schulz, E. 2002. *100 Jahre Statistischer Düngungsversuch Bad Lauchstädt*. UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Leipzig.
- Körschens, M. & Pfefferkorn, A. 1998. *Bad Lauchstädt - Der Statische Düngungsversuch und andere Feldversuche*. UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Leipzig.
- Krauss, M. & Wilcke, W. 2002. Sorption Strength of Persistent Organic Pollutants in Particle-size Fractions of Urban Soils. *Soil Science Society of America Journal*, **66**, 430-437.
- Kropf, S., Heuer, H., Grüning, M. & Smalla, K. 2004. Significance test for comparing complex microbial community fingerprints using pairwise similarity measures. *Journal of Microbiological Methods*, **57**, 187-195.
- Ladd, J. N., Foster, R. C. & Skjemstad, J. O. 1993. Soil Structure - Carbon and Nitrogen-Metabolism. *Geoderma*, **56**, 401-434.
- Lam, P., Jensen, M. M., Lavik, G., McGinnis, D. F., Müller, B., Schubert, C. J., Amann, R., Thamdrup, B. & Kuypers, M. M. M. 2007. Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 7104-7109.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics (eds E.Stackebrandt & M.Goodfellow), pp. 115-175. Wiley, Chichester, New York.
- Larkin, M. J., Kulakov, L. A. & Allen, C. C. 2005. Biodegradation and Rhodococcus - masters of catabolic versatility. *Current Opinion in Biotechnology*, **16**, 282-290.
- Lee, Z. M.-P., Bussema, C. & Schmidt, T. M. 2009. rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Research*, **37**, D489-D493.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C. & Schleper, C. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, **442**, 806-809.
- Leinweber, P., Schulten, H. R. & Körschens, M. 1994. Seasonal-Variations of Soil Organic-Matter in A Long-Term Agricultural Experiment. *Plant and Soil*, **160**, 225-235.
- Leinweber, P., Schulten, H.-R. & Körschens, M. 1995. Hot water extracted organic matter: chemical composition and temporal variations in a long-term field experiment. *Biology and Fertility of Soils*, **20**, 17-23.

- Lensi, R., Clays-Josserand, A. & Monrozier, L. J. 1995. Denitrifiers and denitrifying activity in size fractions of a mollisol under permanent pasture and continuous cultivation. *Soil Biology & Biochemistry*, **27**, 61-69.
- Lillis, L., Clipson, N. & Doyle, E. 2010. Quantification of catechol dioxygenase gene expression in soil during degradation of 2,4-dichlorophenol. *FEMS Microbiology Ecology*, **73**, 363-369.
- Lillis, L., Doyle, E. & Clipson, N. 2009. Comparison of DNA- and RNA-based bacterial community structures in soil exposed to 2,4-dichlorophenol. *Journal of Applied Microbiology*, **107**, 1883-1893.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. & Forney, L. J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 4516-4522.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. & Schleifer, K.-H. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, **32**, 1363-1371.
- Lueders, T., Manefield, M. & Friedrich, M. W. 2004. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology*, **6**, 73-78.
- Madsen, E. L. 1996. A critical analysis of methods for determining the composition and biogeochemical activities of soil microbial communities in situ. In: Soil biochemistry (eds G.Stotzky & J.M.Bollag), pp. 287-370.
- Manefield, M., Whiteley, A. S., Griffiths, R. I. & Bailey, M. J. 2002. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to Phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5367-5373.
- Margesin, R., Fonteyne, P. A. & Redl, B. 2005. Low-temperature biodegradation of high amounts of phenol by *Rhodococcus* spp. and basidiomycetous yeasts. *Research in Microbiology*, **156**, 68-75.
- Marschner, P., Kandeler, E. & Marschner, B. 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**, 453-461.
- Martin, K. & Rygielwicz, P. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, **5**, 28.

- Meijboom, F. W., Hassink, J. & Van Noordwijk M. 1995. Density fractionation of soil macroorganic matter using silica suspensions. *Soil Biology & Biochemistry*, **27**, 1109-1111.
- Monrozier, L. J., Ladd, J. N., Fitzpatrick, R. W., Foster, R. C. & Raupach, M. 1991. Components and Microbial Biomass Content of Size Fractions in Soils of Contrasting Aggregation. *Geoderma*, **50**, 37-62.
- Moore, J. M., Klose, S. & Tabatabai, M. A. 2000. Soil microbial biomass carbon and nitrogen as affected by cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*, **31**, 200-210.
- Morra, M. J., Blank, R. R., Freeborn, L. L. & Shafii, B. 1991. Size Fractionation of Soil Organo-Mineral Complexes Using Ultrasonic Dispersion. *Soil Science*, **152**, 294-303.
- Mörsen, A. & Rehm, H. J. 1990. Degradation of phenol by a defined mixed culture immobilized by adsorption on activated carbon and sintered glass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **33**, 206-212.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: Methods in Enzymology Recombinant DNA Part F (ed W. Ray), pp. 335-350. Academic Press.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 695-700.
- Nakagawa, A., Osawa, S., Hirata, T., Yamagishi, Y., Hosoda, J. & Horikoshi, T. 2006. 2,4-dichlorophenol degradation by the soil fungus *Mortierella* sp. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **70**, 525-527.
- Nishizawa, T., Zhaorigetu, Komatsuzaki, M., Sato, Y., Kaneko, N. & Ohta, H. 2010. Molecular Characterization of Fungal Communities in Non-Tilled, Cover-Cropped Upland Rice Field Soils. *Microbes and Environments*, **25**, 204-210.
- North, P. F. 1976. Towards An Absolute Measurement of Soil Structural Stability Using Ultrasound. *Journal of Soil Science*, **27**, 451-459.
- Oades, J. M. 1993. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma*, **56**, 377-400.
- Oades, J. M. & Waters, A. G. 1991. Aggregate hierarchy in soils. *Soil Research*, **29**, 815-828.
- Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L. & Schleper, C. 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology*, **5**, 787-797.

OECD 2000. Test No. 106: Adsorption -- Desorption Using a Batch Equilibrium Method. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*.

Oorts, K., Vanlauwe, B., Recous, S. & Merckx, R. 2005. Redistribution of particulate organic matter during ultrasonic dispersion of highly weathered soils. *European Journal of Soil Science*, **56**, 77-91.

Pace, N. R. 1997. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science*, **276**, 734-740.

Padmanabhan, P., Padmanabhan, S., DeRito, C., Gray, A., Gannon, D., Snape, J. R., Tsai, C. S., Park, W., Jeon, C. & Madsen, E. L. 2003. Respiration of C-13-labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16S rRNA gene analysis of C-13-labeled soil DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 1614-1622.

Page, A. L. 1982. *Method of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties, Second edition*. American Society of Agronomy, Inc and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin USA.

Paul, E. A. 2007. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Academic Press, Oxford.

Peacock, A. D., Mullen, M. D., Ringelberg, D. B., Tyler, D. D., Hedrick, D. B., Gale, P. M. & White, D. C. 2001. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**, 1011-1019.

Pelz, O., Abraham, W. R., Saurer, M., Siegwolf, R. & Zeyer, J. 2005. Microbial assimilation of plant-derived carbon in soil traced by isotope analysis. *Biology and Fertility of Soils*, **41**, 153-162.

Perkins, E. J., Gordon, M. P., Caceres, O. & Lurquin, P. F. 1990. Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *The Journal of Bacteriology*, **172**, 2351-2359.

Pettersson, E., Lundeberg, J. & Ahmadian, A. 2009. Generations of sequencing technologies. *Genomics*, **93**, 105-111.

Philippot, L., Renault, P., Sierra, J., Henault, C., Clays-Josserand, A., Chenu, C., Chaussod, R. & Lensi, R. 1996. Dissimilatory nitrite-reductase provides a competitive advantage to *Pseudomonas* sp. RTC01 to colonise the centre of soil aggregates. *FEMS Microbiology Ecology*, **21**, 175-185.

Poll, C., Thiede, A., Wermbter, N., Sessitsch, A. & Kandeler, E. 2003. Micro-scale distribution of microorganisms and microbial enzyme activities in a soil with long-term organic amendment. *European Journal of Soil Science*, **54**, 715-724.

Postma, J. & van Veen, J. A. 1990. Habitable pore space and survival of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil. *Microbial Ecology*, **19**, 149-161.

- Prosser, J. I. & Nicol, G. W. 2008. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environmental Microbiology*, **10**, 2931-2941.
- Providenti, M. A., Lee, H. & Trevors, J. T. 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **12**, 379-395.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J. & Glöckner, F. O. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, **35**, 7188-7196.
- Puget, P., Chenu, C. & Balesdent, J. 2000. Dynamics of soil organic matter associated with particle-size fractions of water-stable aggregates. *European Journal of Soil Science*, **51**, 595-605.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R. & Murrell, J. C. 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, **403**, 646-649.
- Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbiere, F., Thioulouse, J., Linet, P. & Richaume, A. 2000. A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg(II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. *FEMS Microbiology Ecology*, **31**, 107-115.
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A. & Nazaret, S. 1998. A single procedure to recover DNA from the surface or inside aggregates and in various size fractions of soil suitable for PCR-based assays of bacterial communities. *European Journal of Soil Biology*, **34**, 89-97.
- Ranjard, L. & Richaume, A. S. 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, **152**, 707-716.
- Rappé, M. S. & Giovannoni, S. J. 2003. The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review of Microbiology*, **57**, 369-394.
- Rillig, M. C. & Mummey, D. L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, **171**, 41-53.
- Ritz, K. & Young, I. M. 2004. Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist*, **18**, 52-59.
- Roscoe, R., Buurman, P. & Velthorst, E. J. 2000. Disruption of soil aggregates by varied amounts of ultrasonic energy in fractionation of organic matter of a clay Latosol: carbon, nitrogen and delta13C distribution in particle-size fractions. *European Journal of Soil Science*, **51**, 445-454.

- Sanger, F., Coulson, A. R., Friedmann, T., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Fiddes, J. C., Hutchison III, C. A., Slocombe, P. M. & Smith, M. 1978. The nucleotide sequence of bacteriophage phi X174. *Journal of Molecular Biology*, **125**, 225-246.
- Schleper, C., Jurgens, G. & Jonscheit, M. 2005. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 479-488.
- Schulten, H. R., Leinweber, P. & Sorge, C. 1993. Composition of organic matter in particle-size fractions of an agricultural soil. *Journal of Soil Science*, **44**, 677-691.
- Schulten, H.-R. & Leinweber, P. 1999. Thermal stability and composition of mineral-bound organic matter in density fractions of soil. *European Journal of Soil Science*, **50**, 237-248.
- Schwieger, F. & Tebbe, C. C. 1998. A New Approach To Utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 4870-4876.
- Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M. H., Kirchmann, H. & Kandeler, E. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4215-4224.
- Shaw, Beaton, Glover, Killham & Meharg 1999. Development and characterization of a lux-modified 2,4-dichlorophenol-degrading Burkholderia sp. RASC. *Environmental Microbiology*, **1**, 393-399.
- Shaw, L. J., Beaton, Y., Sousa, S., Glover, L. A., Killham, K. & Meharg, A. A. 2002. Mineralisation of 2,4-dichlorophenol and glucose placed into the same or different hydrological domains as a bacterial inoculant. *Soil Biology & Biochemistry*, **34**, 531-539.
- Short, K. A., Doyle, J. D., King, R. J., Seidler, R. J., Stotzky, G. & Olsen, R. H. 1991. Effects of 2,4-Dichlorophenol, a Metabolite of a Genetically Engineered Bacterium, and 2,4-Dichlorophenoxyacetate on Some Microorganism-Mediated Ecological Processes in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 412-418.
- Singh, S. & Singh, J. S. 1995. Microbial biomass associated with water-stable aggregates in forest, savanna and cropland soils of a seasonally dry tropical region, India. *Soil Biology & Biochemistry*, **27**, 1027-1033.
- Singleton, D. R., Powell, S. N., Sangaiah, R., Gold, A., Ball, L. M. & Aitken, M. D. 2005. Stable-isotope probing of bacteria capable of degrading salicylate, naphthalene, or phenanthrene in a bioreactor treating contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 1202-1209.
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S. & Denef, K. 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil & Tillage Research*, **79**, 7-31.

- Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R., Neuber, G., Kropf, S., Ulrich, A. & Tebbe, C. C. 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods*, **69**, 470-479.
- Smith, C. & Osborn, A. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, **67**.
- Smith, C. J., Nedwell, D. B., Dong, L. F. & Osborn, A. M. 2006. Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environmental Microbiology*, **8**, 804-815.
- Sposito, G. 1984. *The surface chemistry of soils*. Oxford University Press, New York.
- Stamatakis, A. P., Ludwig, T. & Meier, H. 2004. The AxML program family for maximum likelihood-based phylogenetic tree inference. *Concurrency and Computation: Practice and Experience*, **16**, 975-988.
- Stemmer, M., Gerzabek, M. H. & Kandeler, E. 1998. Organic matter and enzyme activity in particle-size fractions of soils obtained after low-energy sonication. *Soil Biology & Biochemistry*, **30**, 9-17.
- Surridge, A. K. J., Wehner, F. C. & Cloete, T. E. 2009. Bioremediation of Polluted Soil Advances in Applied Bioremediation. (eds A.Singh *et al.*), pp. 103-121. Springer Berlin Heidelberg.
- Tamura, K., Dudley, J. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Taylor, J. P., Wilson, B., Mills, M. S. & Burns, R. G. 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology & Biochemistry*, **34**, 387-401.
- Tebbe, C. C. & Schloter, M. 2006. Discerning the diversity of soil procaryotes (Bacteria and Archaea) and their impact on agriculture. In: Biodiversity In Agricultural Production Systems (eds G.Benckiser & S.Schnell), pp. 81-100. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Tiller, K. G. & Smith, L. H. 1990. Limitations of EGME retention to estimate the surface area of soils. *Soil Research*, **28**, 1-26.
- Tisdall, J. M. & Oades, J. M. 1982. Organic-Matter and Water-Stable Aggregates in Soils. *Journal of Soil Science*, **33**, 141-163.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. & Daae, F. L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 782-787.

- Totsche, K. U., Rennert, T., Gerzabek, M. H., Kogel-Knabner, I., Smalla, K., Spiteller, M. & Vogel, H. J. 2010. Biogeochemical interfaces in soil: The interdisciplinary challenge for soil science. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **173**, 88-99.
- Treusch, A. H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S. C., Klenk, H. P. & Schleper, C. 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, **7**, 1985-1995.
- Uyttebroek, M., Breugelmans, P., Janssen, M., Wattiau, P., Joffe, B., Karlson, U., Ortega-Calvo, J. J., Bastiaens, L., Ryngaert, A., Hausner, M. & Springael, D. 2006. Distribution of the Mycobacterium community and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) among different size fractions of a long-term PAH-contaminated soil. *Environmental Microbiology*, **8**, 836-847.
- Väisänen, R. K., Roberts, M. S., Garland, J. L., Frey, S. D. & Dawson, L. A. 2005. Physiological and molecular characterisation of microbial communities associated with different water-stable aggregate size classes. *Soil Biology & Biochemistry*, **37**, 2007-2016.
- Vallaey, T., Courde, L., Mc Gowan, C., Wright, A. D. & Fulthorpe, R. R. 1999. Phylogenetic analyses indicate independent recruitment of diverse gene cassettes during assemblage of the 2,4-D catabolic pathway. *FEMS Microbiology Ecology*, **28**, 373-382.
- Van Gestel, M., Merckx, R. & Vlassak, K. 1996. Spatial distribution of microbial biomass in microaggregates of a silty-loam soil and the relation with the resistance of microorganisms to soil drying. *Soil Biology & Biochemistry*, **28**, 503-510.
- Van Veen, J. & Kuikman, P. 1990. Soil structural aspects of decomposition of organic matter by micro-organisms. *Biogeochemistry*, **11**, 213-233.
- Vance, E. D., Brookes, P. C. & Jenkinson, D. S. 1987. An Extraction Method for Measuring Soil Microbial Biomass-C. *Soil Biology & Biochemistry*, **19**, 703-707.
- Vijayaraghavan, S., Srinivasaraghavan, T., Musti, S., Kar, S., Swaminathan, T. & Baradarajan, A. 1995. Biodegradation of phenol by arthrobacter and modelling of the kinetics. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **12**, 227-229.
- Vogt, M. 2004. Verteilung des Kohlenstoffs beim Abbau von ¹⁴C-markiertem Weizenstroh in den verschiedenen Kompartimenten eines Bodens mit unterschiedlicher Bewirtschaftung. *Dissertation*, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- von Wintzingerode, F., Gobel, U. B. & Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, **21**, 213-229.
- Wackett, L. P. & Hershberger, C. D. 2001. *Biocatalysis and biodegradation*. ASM press, Washington.

Wessen, E., Hallin, S. & Philippot, L. 2010a. Differential responses of bacterial and archaeal groups at high taxonomical ranks to soil management. *Soil Biology & Biochemistry*, **42**, 1759-1765.

Wessen, E., Nyberg, K., Jansson, J. K. & Hallin, S. 2010b. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management. *Applied Soil Ecology*, **45**, 193-200.

Whelan, Simon, Liò, Pietro, & Goldman, Nick. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *Trends in genetics : TIG* 17[5], 262-272. 1-5-2001.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Analysis of phylogenetic relationship by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: *PCR Protocols a guide to methods and applications*, edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, Academic Press, pp. 315-322.

Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. 1990. Towards A Natural System of Organisms - Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 4576-4579.

Wolf, D. C., Dao, T. H., Scott, H. D. & Lavy, T. L. 1989. Influence of Sterilization Methods on Selected Soil Microbiological, Physical, and Chemical-Properties. *Journal of Environmental Quality*, **18**, 39-44.

Wright, D. A., Killham, K., Glover, L. A. & Prosser, J. I. 1995. Role of Pore Size Location in Determining Bacterial Activity during Predation by Protozoa in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 3537-3543.

Xing, B. & Pignatello, J. J. 1996. Time-dependent isotherm shape of organic compounds in soil organic matter: Implications for sorption mechanism. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**, 1282-1288.

Zhang, L. M., Offre, P. R., He, J. Z., Verhamme, D. T., Nicol, G. W. & Prosser, J. I. 2010. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 17240-17245.

7. Anhang

7.1 Primerliste

Tab. 55 Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Name	<i>E.coli</i> -Position (16S rRNA-Gen)	Sequenz (5' - 3')	Referenz	Anwendung
<i>Bacteria</i>				
F27*	8 - 27	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Lane <i>et al.</i> 1991	qPCR-Standard, T-RFLP
1392R	1391 - 1406	ACG GGC GGT GTG TAC A	Blackwood <i>et al.</i> 2005	qPCR-Standard
926r	926 - 946	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	Liu <i>et al.</i> 1997	T-RFLP
Com 1	519 - 536	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	Schwieger & Tebbe 1998	Klon-Bibliothek, SSCP
Com 2**	907 - 926	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	Schwieger & Tebbe 1998	Klon-Bibliothek, SSCP
Eub338	338 - 357	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	Lane <i>et al.</i> 1991	qPCR
Eub518	518 - 534	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Muyzer <i>et al.</i> 1993	qPCR
<i>Archaea</i>				
A109f	109 - 125	ACK GCT CAG TAA CAC GT	Grosskopf <i>et al.</i> 1998	qPCR-Standard
Ar1384r	1384 - 1401	CGG TGT GTG CAA GGA GCA	Lueders <i>et al.</i> 2004	qPCR-Standard
A364aF***	346 - 364	CGG GGY GCA SCA GGC GCG AA	Burggraf <i>et al.</i> 1997	qPCR, T-RFLP
519R	515 - 533	TTA CCG CGG CGG CTG RCA C	Lam <i>et al.</i> 2007	qPCR
A934bF	915 - 934	AGG AAT TGG CGG GGG AGC AC	Grosskopf <i>et al.</i> 1998	qPCR
1119R	1001 - 1119	GGY RNG GRT CTC GCT CGT T	Burggraf <i>et al.</i> 1997	qPCR
771F	753 - 771	ACR GTG AGG GAY GAA AGC T	Ochsenreiter <i>et al.</i> 2003	qPCR
A934bR*	915 - 934	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Grosskopf <i>et al.</i> 1998	qPCR, T-RFLP
<i>Fungi</i>				
ITS1	-	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Gardes <i>et al.</i> 1993	Klon-Bibliothek
ITS1f*	-	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	Gardes <i>et al.</i> 1993	T-RFLP
ITS4r	-	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White <i>et al.</i> 1990	Klon-Bibliothek, T-RFLP
NSI1	-	GAT TGA ATG GCT TAG TGA GG	Martin & Rygiewicz 2005	qPCR, SSCP
58A2R**	-	CTG CGT TCT TCA TCG AT	Martin & Rygiewicz 2005	qPCR, SSCP
NSA3	-	AAA CTC TGT CGT GCT GGG GAT A	Martin & Rygiewicz 2005	qPCR-Standard
NLC2	-	GAG CTG CAT TCC CAA ACA ACT C	Martin & Rygiewicz 2005	qPCR-Standard

*= mit Cy5 Markierung bei der T-RFLP, **= phosphoryliert bei der SSCP, ***= bei der qPCR modifiziert verwendet (vgl. Tab. 38)

7.2 Weitere T-RFLP-Profile

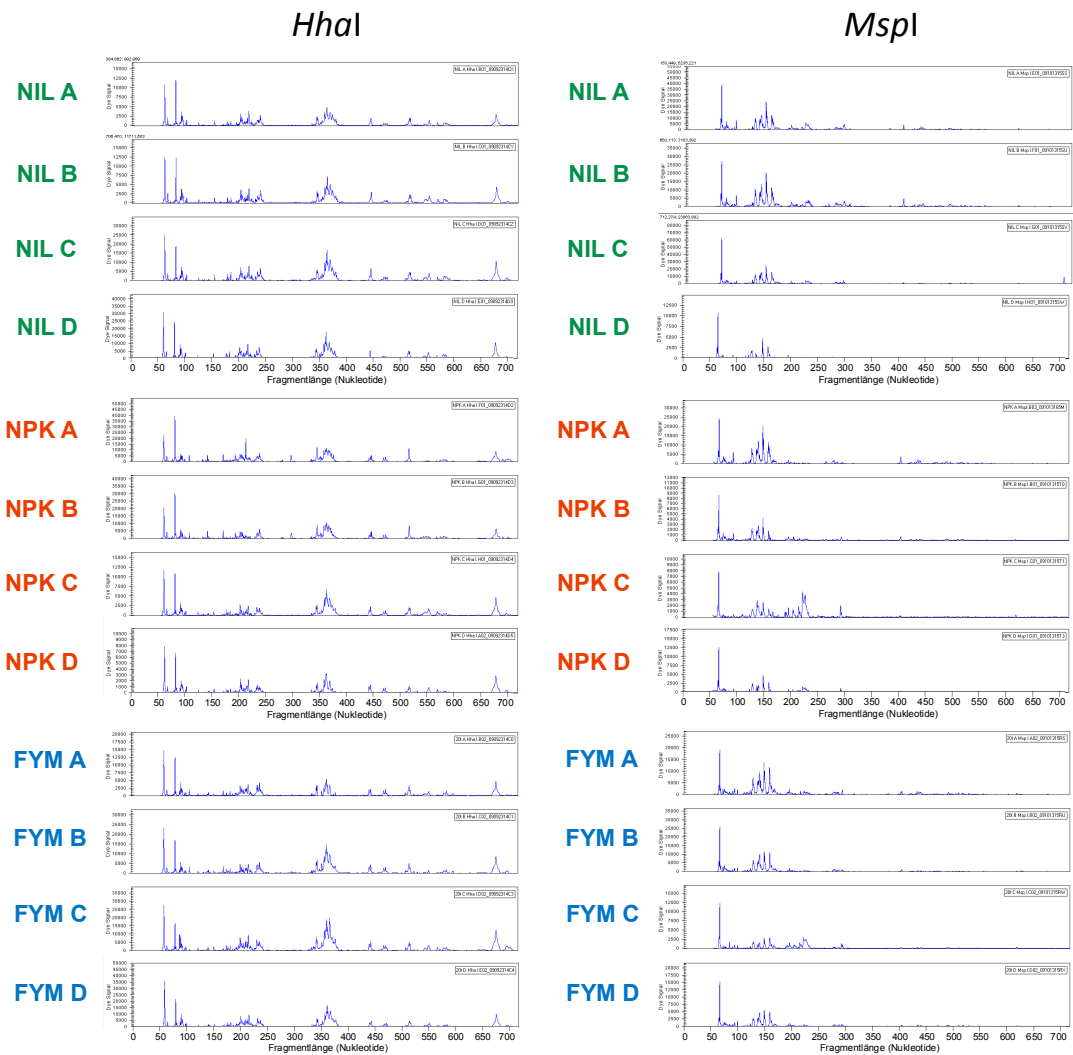


Abb. 68 *Bacteria* T-RFLP-Profile der nicht-fraktionierten Bodenvarianten nach dem Restriktionsverdau mit *HhaI* bzw. *MspI*.

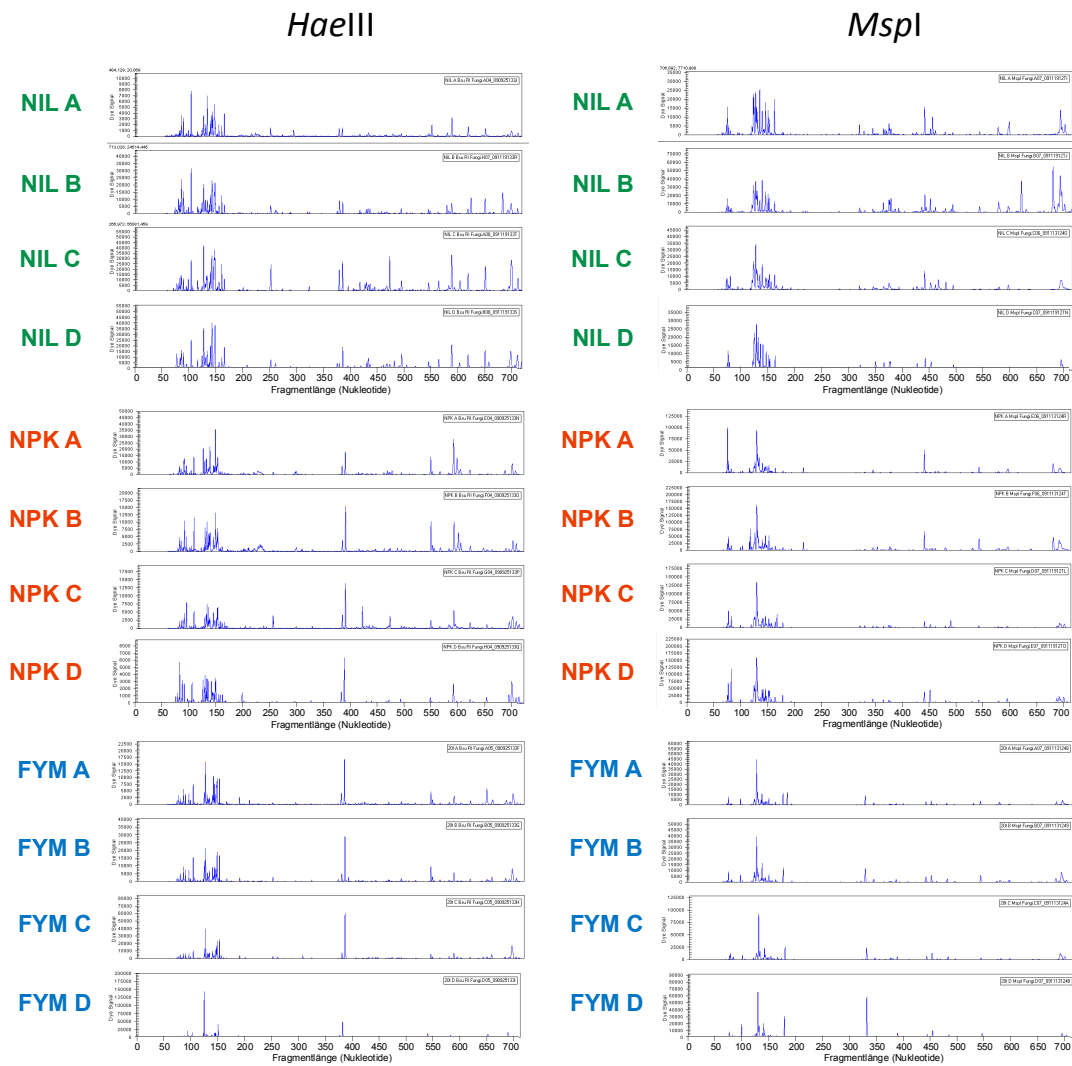


Abb. 69 Fungi T-RFLP-Profile der nicht-fractionierten Bodenvarianten nach dem Restriktionsverdau mit *HaeIII* und *MspI*.

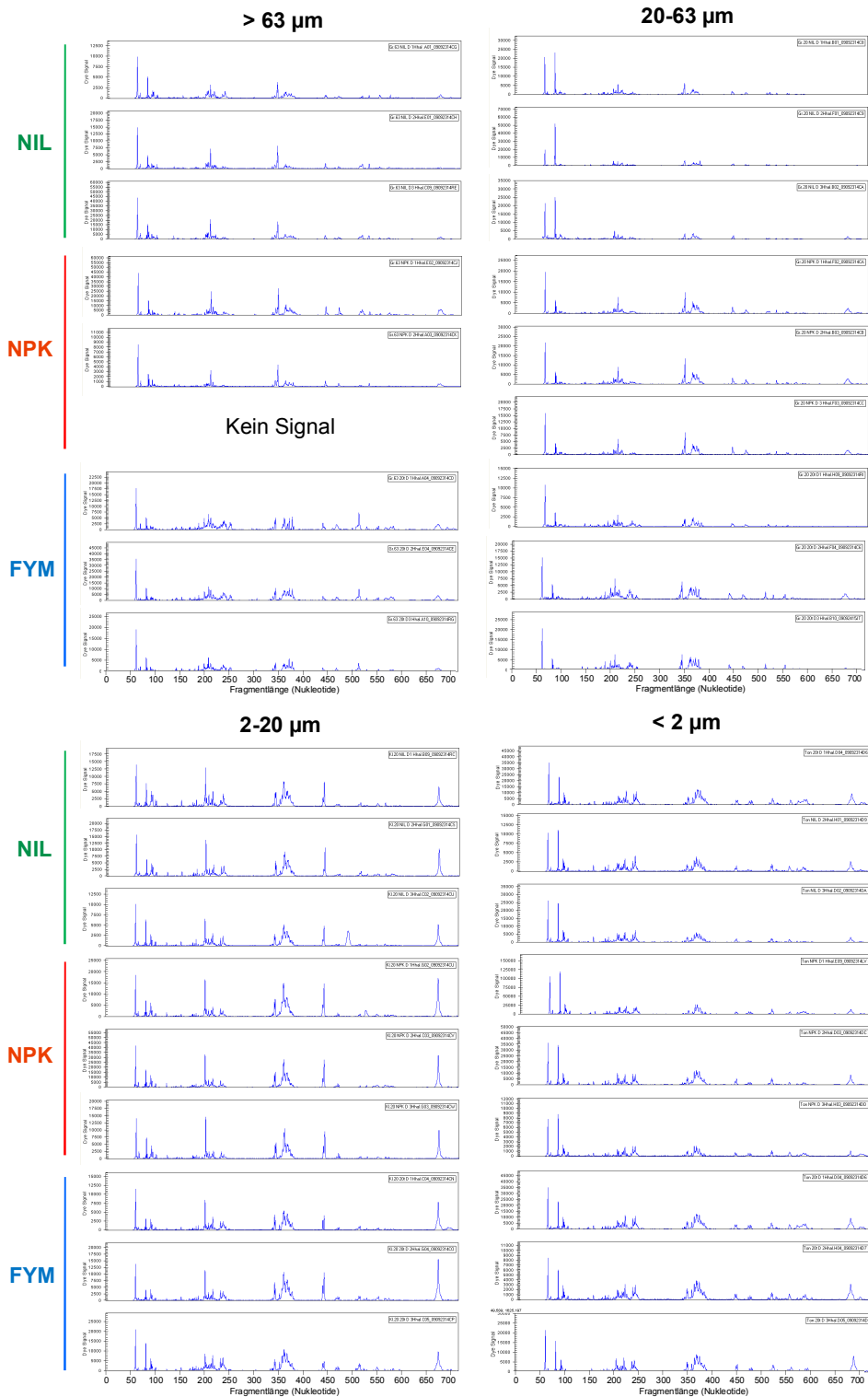


Abb. 70 *Bacteria* T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit *HhaI*).

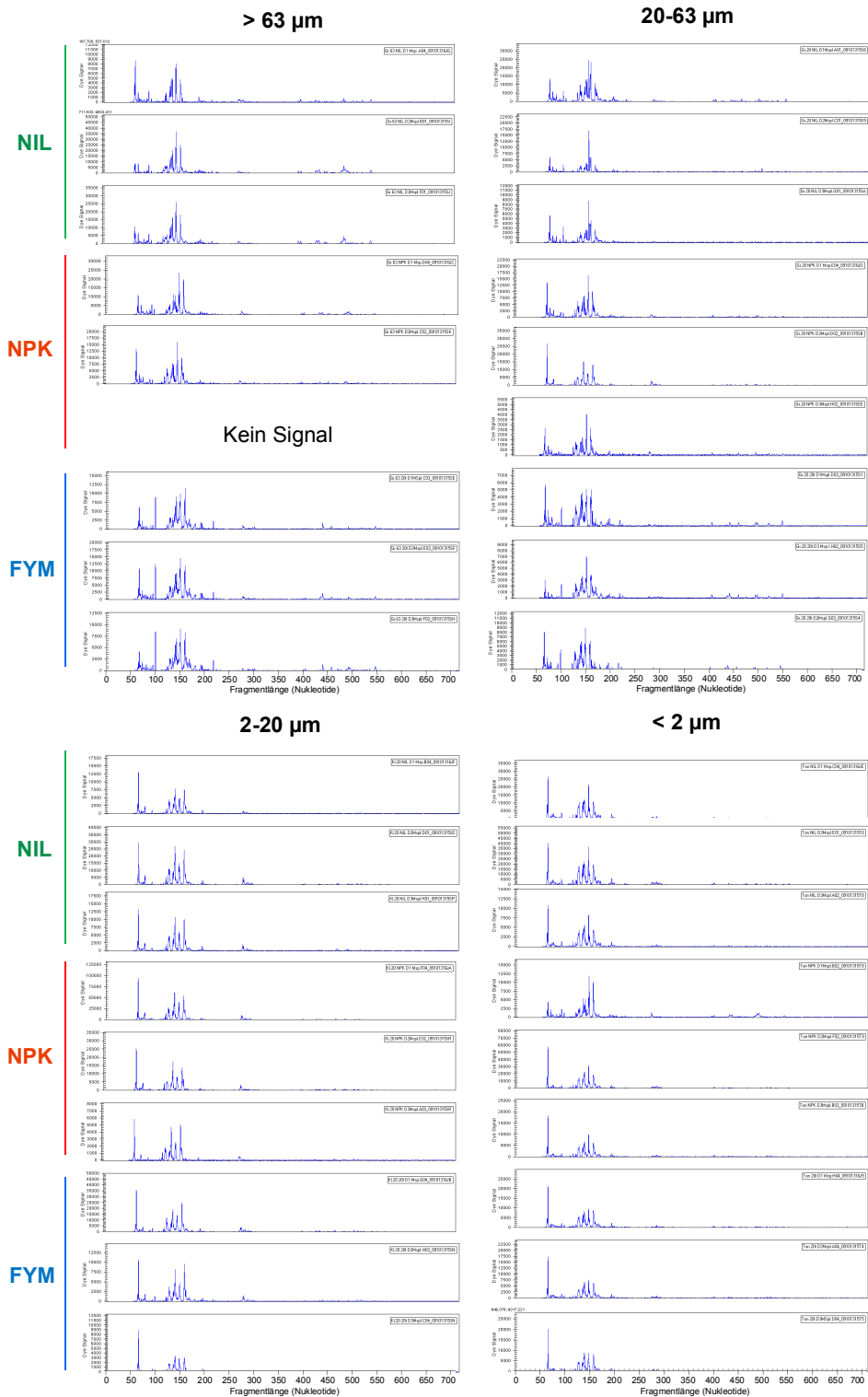


Abb. 71 *Bacteria* T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit *MspI*).

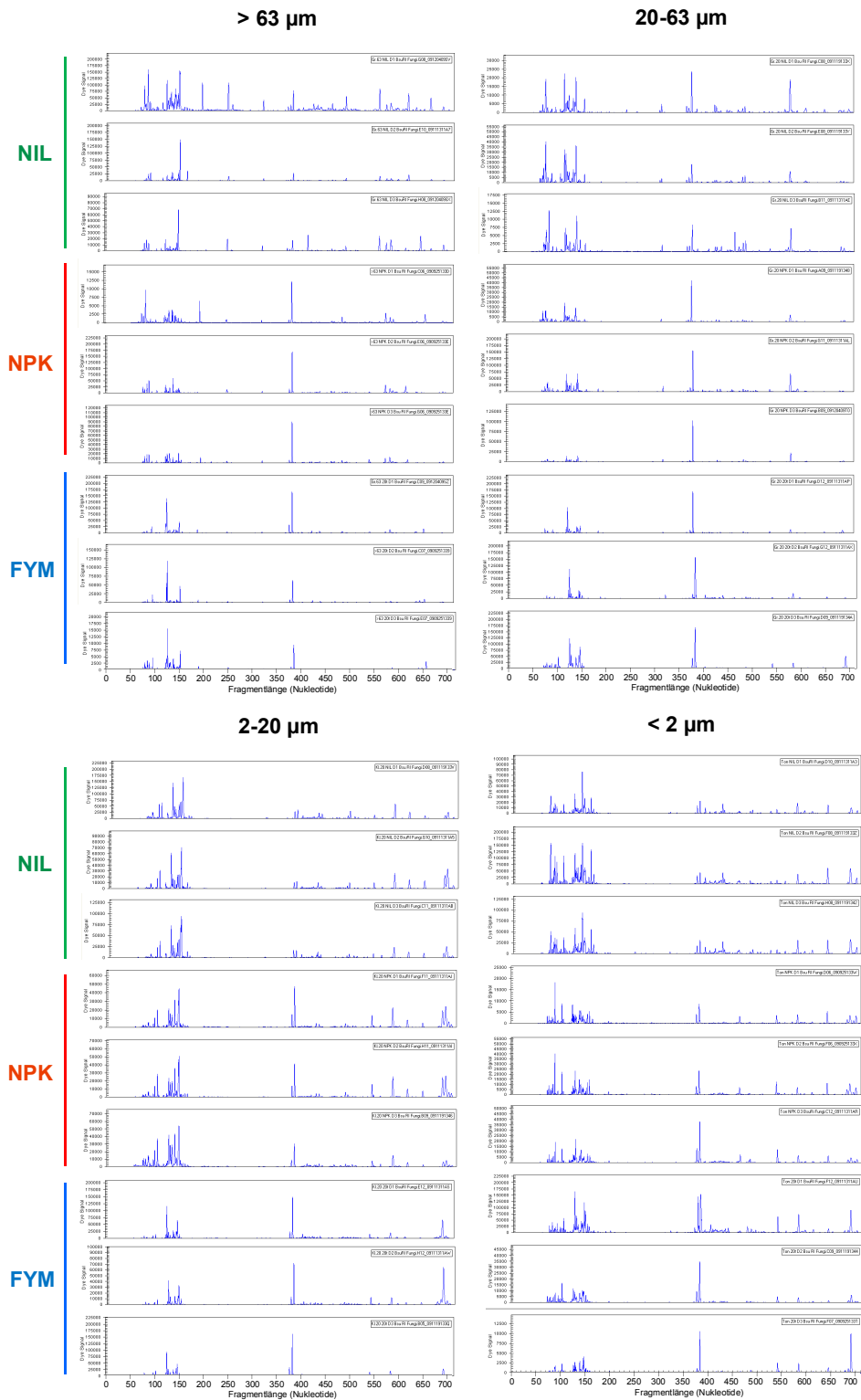


Abb. 72 *Fungi* T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit *HaeIII*).

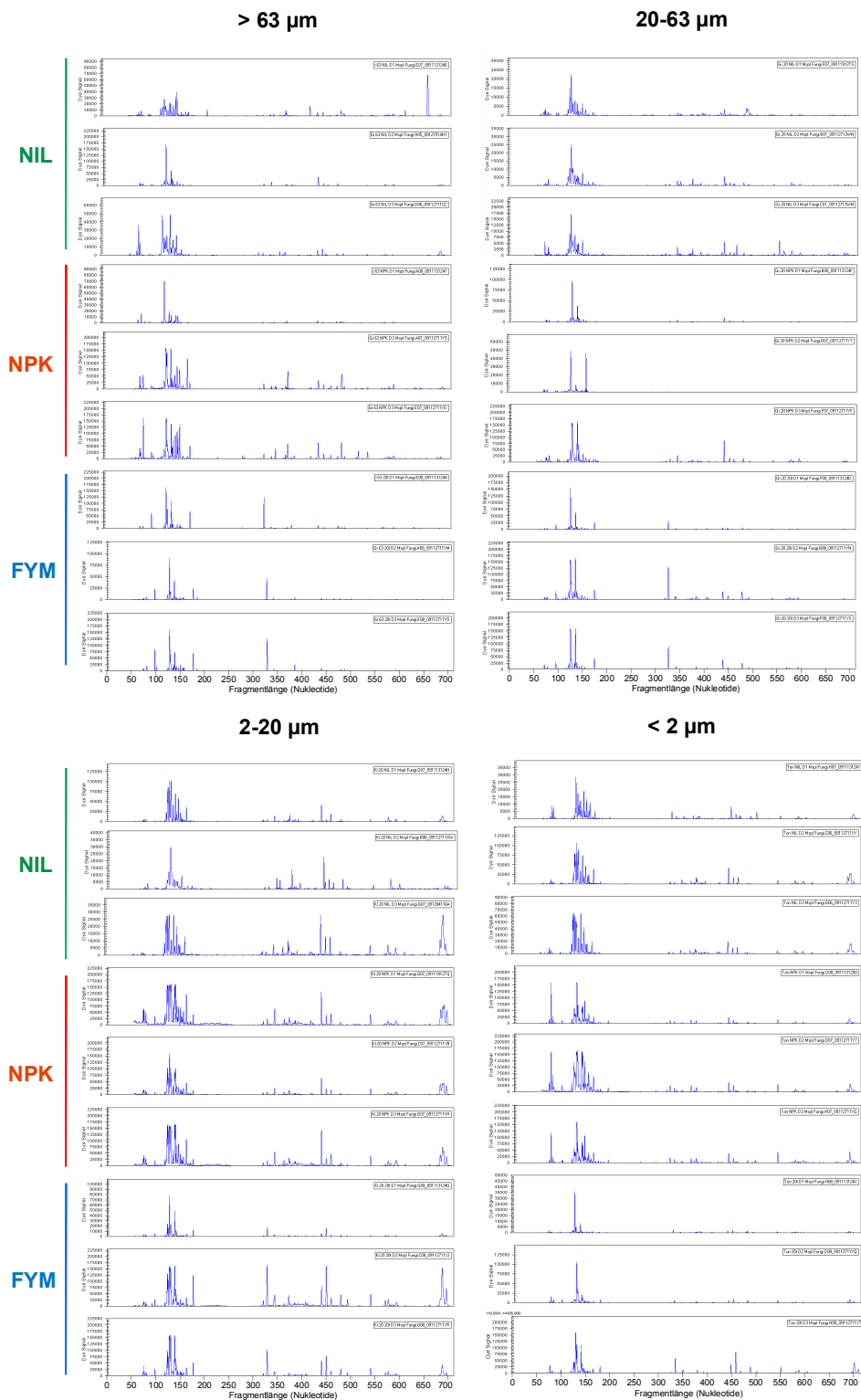


Abb. 73 *Fungi* T-RFLP-Profil der Korngrößenfraktionen (Restriktionsverdau mit *MspI*).

7.3 Ergebnisse der Permutationstests

Nicht-fraktionierter Boden

Tab. 56 P-Werte der Permutationstests für den Vergleich der Bodenvariante der *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi* T-RFLP-Profile des nicht-fraktionierten Bodens.

Verglichene Bodenvarianten			P-Wert		
			<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Fungi</i>
		alle	0,0983	0,025331	0,000175
NIL	vs.	NPK	0,286472	0,371833	0,02868
NIL	vs.	FYM	0,113679	0,028431	0,028431
NPK	vs.	FYM	0,199657	0,199787	0,028177

Korngrößenfraktionen

Tab. 57 P-Werte der Permutationstests für den Vergleich der Bodenvariante der *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi* T-RFLP-Profile der Korngrößenfraktionen unabhängig von der Korngröße

Verglichene Bodenvarianten			P-Wert		
			<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Fungi</i>
		alle	0,007771	0	0
NIL	vs.	NPK	0,250952	0,477073	0,000636
NIL	vs.	FYM	0,006223	0	0
NPK	vs.	FYM	0,023208	0,000002	0,000122

Tab. 58 P-Werte der Permutationstests für den Vergleich der Korngrößenfraktionen der *Bacteria*, *Archaea* und *Fungi* T-RFLP-Profile unabhängig von der Bodenvariante.

Verglichene Korngrößen			P-Wert		
			<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Fungi</i>
		alle	0	0,000013	0
>63 µm	vs.	20-63 µm	0,060684	0,511342	0,01911
>63 µm	vs.	2-20 µm	0,000033	0,000658	0,00004
>63 µm	vs.	< 2 µm	0,000038	0,001753	0,00044
20-63 µm	vs.	2-20 µm	0,000041	0,000253	0,00007
20-63 µm	vs.	< 2 µm	0,000038	0,018995	0,00040
2-20 µm	vs.	< 2 µm	0,000034	0,000433	0,00149

7.4 Übersicht über die ermittelten DNA-Sequenzen

Tab. 59 Ähnlichkeiten der in dieser Arbeit für die Validierung der Primerpaare bei der qPCR ermittelten DNA-Sequenzen zu Sequenzen aus der NCBI-Datenbank (vgl. Abschnitt 3.3.1.1).

Name	Fraktion	Länge der Partialsequenz	phylogenetische Einordnung	Nächster Verwandter in NCBI-Datenbank	Accession No.	% Ähnlichkeit
A1	> 63 µm	171	Planctomyces	<i>Planctomyces</i> sp.	AM935794*	97
A2	> 63 µm	160	Crenarchaeota	<i>Crenarchaeote</i> sp.	GU797786*	98
A3	> 63 µm	160	Euryarchaeota	<i>Euryarchaeote</i> sp.	EF175728.1*	99
A4	> 63 µm	160	Euryarchaeota	<i>Methanosarcina</i> sp.	AB541615*	98
A5, A8, A9, A18	20-63 µm, < 2µm	160	Crenarchaeota	<i>Crenarchaeote</i> sp.	EU888376*	99 - 100
A6, A12, A14	20-63 µm	160	Crenarchaeota	<i>Crenarchaeote</i> sp.	HQ316981*	100
A7	20-63 µm	160	Archaea	<i>Archaeon</i> sp.	AB541745*	100
A10	20-63 µm	160	Euryarchaeota	<i>Methanosarcina</i> sp.	EU857628*	99
A11, A15	20-63 µm, 2-20 µm	155 bzw. 160	Crenarchaeota	<i>Crenarchaeote</i> sp.	EU888374*	99 - 100
A13	2-20 µm	160	Crenarchaeota	<i>Crenarchaeote</i> sp.	AB116406*	100
A16	< 2 µm	171	Planctomyces	<i>Planctomyces</i> sp.	CU917467*	98
A17	< 2 µm	160	Crenarchaeota	<i>Crenarchaeote</i> sp.	AJ627422*	98
F1	> 63 µm	307	Basidiomycota	<i>Microbotryomycetes</i> sp.	FN548148*	92
F2	> 63 µm	296	Ascomycota	<i>Neonectria</i> sp.	FJ552996	93
F3	> 63 µm	308	Ascomycota	<i>Ascomycota</i>	AJ302003*	83
F4	> 63 µm	305	Fungi incertae sedis	<i>Zygomycete</i> sp.	EF428773	100
F5	> 63 µm	303	Fungi incertae sedis	<i>Zygomycete</i> sp.	FJ552818	96
F6, F9	20-63 µm	336	Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp.	AB505424	96
F7	20-63 µm	305	Ascomycota	<i>Ascomycete</i> sp.	AM410602	99
F8, F14	20-63 µm, 2-20 µm	297	Ascomycota	<i>Ascomycete</i> sp.	AM901905	99
F10	2-20 µm	304 (363)	Basidiomycota	<i>Basidiomycete</i> sp.	DQ421079	99
F11	2-20 µm	302	Ascomycota	<i>Ascomycota</i>	FJ554224	84
F12	2-20 µm	317	Ascomycota	<i>Sordariales</i> sp.	FJ553548*	94
F13	2-20 µm	315	Ascomycota	<i>Ascomycota</i>	AJ301993*	85
F15	< 2 µm	309	Ascomycota	<i>Periconia</i> sp.	AJ246159	98
F16	< 2 µm	288 (347)	Ascomycota	<i>Ascomycota</i>	GQ225117	100
F17	< 2 µm	308	Ascomycota	<i>Ascomycota</i>	EU315012	84
F18	< 2 µm	305	Basidiomycota	<i>Basidiomycete</i> sp.	AM901917	100

Tab. 60 Ähnlichkeiten der in dieser Arbeit für SSCP-Banden der schweren Dichte-Fractionen ermittelten DNA-Sequenzen zu Sequenzen aus der NCBI-Datenbank (vgl. Abschnitt 3.4.3).

Bande Nr.	Länge der Partialsequenz	phylogenetische Einordnung	Nächster Verwandter in NCBI-Datenbank	Accession No.	% Ähnlichkeit
<i>Phenol, Bacteria</i> (vgl. Abb. 53, Tab. 47)					
1	373	Bacteria	Uncultured Bacterium	GQ472363	95
2,8	372	Actinobacteria	<i>Blastococcus</i> sp.	AM936514*	99
3,4,9,10, 14,15,19,20	371	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i> sp.	CP000431*	99 - 100
5, 11, 12, 13, 16, 17, 21	372	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp.	AB531417*	99 - 100
6	370	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	FJ889294*	100
7	369	Betaproteobacteria	<i>Variovorax</i> sp.	DQ118732*	100
18, 22	369	Betaproteobacteria	Oxalobacteraceae bacterium	AY624622*	100
<i>Phenol, Fungi</i> (vgl. Abb. 57, Tab. 48)					
1,4,7	313	Ascomycota	<i>Mariannaea elegans</i>	AB111493	82 - 87
2,5,6,8	323	Basidiomycota	<i>Basidiomycete</i> sp.	AM901762*	95
3	305	Fungi <i>incertae sedis</i>	<i>Zygomycete</i> sp.	EU428773*	100
9	296	Ascomycota	<i>Ascomycete</i> sp.	DQ980574*	99
<i>2,4-DCP, Bacteria</i> (vgl. Abb. 63, Tab. 49)					
1,2	369	Betaproteobacteria	<i>Burkholderia</i> sp.	EU827482*	100
3,4	354 bzw. 369	Betaproteobacteria	<i>Burkholderia</i> sp.	EF073473*	99 - 100
5,6	369	Betaproteobacteria	<i>Variovorax</i> sp.	AF538929*	100

Tab. 61 *Bacteria* Klon-Bibliothek der schweren Dichte-Fractionen der Bodenvariante NIL nach Inkubation mit ¹³C-Phenol und DNA-SIP (vgl. Abschnitt 3.4.3).

Anzahl der Klone	Länge der Partialsequenz	phylogenetische Einordnung	Nächster Verwandter in NCBI-Datenbank	Accession No.	% Ähnlichkeit
10	371	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i> sp.	GQ174491*	99 - 100
9	371	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i> sp.	AB458522*	99 - 100
1	371	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i> sp.	HM161880*	99
20	372	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp.	JF778723*	99 - 100
1	372	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp.	JF728969*	99
1	371	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria Bacterium sp.	FJ946320*	98
1	369	Alphaproteobacteria	<i>Hyphomicrobium</i> sp.	AY934489*	99
1	371	Actinobacteria	<i>Aeromicrobium</i> sp.	HQ256801*	99
2	370	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ848640*	99 - 100
2	369	Alphaproteobacteria	<i>Skermanella</i> sp.	HQ234263*	99
1	372	Actinobacteria	<i>Nocardioidea</i> sp.	EF466123*	99
1	371	Acidobacteria	<i>Acidobacterium</i> sp.	EF665544*	97
1	371	Actinobacteria	<i>Rubrobacter</i> sp.	GU271567*	99
2	371	Firmicutes	<i>Lactobacillus</i> sp.	FR683103*	99 - 100
1	370	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i> sp.	HM224469*	99
1	370	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i> sp.	HM438629*	99
1	367	Bacteroidetes	Bacteroidetes sp.	EU979043*	99
1	371	Chloroflexi	Chloroflexi sp.	HM196329*	99
1	369	Acidobacteria	<i>Acidobacterium</i> sp.	GU205290*	97

Tab. 62 *Bacteria* Klon-Bibliothek der schweren Dichte-Fractionen der Bodenvariante NPK nach Inkubation mit ¹³C-Phenol und DNA-SIP (vgl. Abschnitt 3.4.3).

Anzahl der Klone	Länge der Partialsequenz	phylogenetische Einordnung	Nächster Verwandter in NCBI-Datenbank	Accession No.	% Ähnlichkeit
2	371	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i> sp.	GQ174491*	99 - 100
18	371	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i> sp.	AB458522*	99 - 100
6	372	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp.	JF778723*	99 - 100
2	372	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp.	JF728969*	99
2	370	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ848640*	99 - 100
1	370	Actinobacteria	<i>Blastococcus</i> sp.	EU193041*	99
1	369	Alphaproteobacteria	Rhizobiales sp.	FJ024502*	96
1	371	Firmicutes	<i>Lactobacillus</i> sp.	GQ332216	99
1	369	Betaproteobacteria	<i>Massilia</i> sp.	JF460974*	100
1	372	Actinobacteria	<i>Nocardioides</i> sp.	GU784866*	99
1	369	Betaproteobacteria	<i>Variovorax</i> sp.	CP002417*	99
1	370	Gammaproteobacteria	Xanthomonadaceae sp.	AM935344*	98
2	369	Betaproteobacteria	<i>Variovorax</i> sp.	HQ263112*	99 - 100
1	371	Deltaproteobacteria	Deltaproteobacteria bacterium sp.	AM072420*	99
1	369	Acidobacteria	<i>Acidobacterium</i> sp.	FJ568786*	99
1	371	Chlamydiae	<i>Protochlamydia</i> sp.	FJ532294*	93
1	369	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria bacterium sp.	FR749766*	99
1	370	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	JF778678*	99
2	370	Actinobacteria	Sphingomonadaceae sp.	GU300232*	98
1	371	Actinobacteria	Rubrobacteraceae sp.	DQ521091*	98
1	372	Actinobacteria	<i>Blastococcus</i> sp.	EU449555*	98
1	372	Actinobacteria	<i>Nocardioides</i> sp.	GQ339902*	98
1	370	Actinobacteria	Actinobacteria bacterium sp.	JF681879*	98
1	371	Actinobacteria	Rubrobacteraceae sp.	FR732265*	100
1	371	Actinobacteria	<i>Nonomuraea</i> sp.	HM368608*	99
1	371	Actinobacteria	Actinobacteria bacterium sp.	HM224518	100
1	371	Deltaproteobacteria	Deltaproteobacteria bacterium sp.	HQ462515*	91
1	373	Actinobacteria	Actinobacteria bacterium sp.	EF020295*	99

Tab. 63 Bacteria Klon-Bibliothek der schweren Dichte-Fractionen der Bodenvariante FYM nach Inkubation mit ^{13}C -Phenol und DNA-SIP (vgl. Abschnitt 3.4.3).

Anzahl der Klone	Länge der Partialsequenz	phylogenetische Einordnung	Nächster Verwandter in NCBI-Datenbank	Accession No.	% Ähnlichkeit
5	371	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i> sp.	GQ174491*	99 - 100
18	371	Actinobacteria	<i>Rhodococcus</i> sp.	AB458522*	99 - 100
1	372	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp.	JF728969*	99
4	370	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ848640*	99 - 100
1	369	Alphaproteobacteria	<i>Pedomicrobium</i> sp.	EF019366*	100
1	372	Actinobacteria	Actinobacteria bacterium sp.	HM269679	99
1	369	Alphaproteobacteria	<i>Mesorhizobium</i> sp.	AB300444*	99
1	371	Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp.	GQ287581*	99
1	371	Actinobacteria	Actinobacteria bacterium sp.	GQ249624	100
1	372	Actinobacteria	<i>Blastococcus</i> sp.	FN178402*	100
1	370	Alphaproteobacteria	<i>Kaistobacter</i> sp.	EU665138*	99
1	371	Actinobacteria	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	D87090	100
1	366	Fusobacteria	<i>Fusobacteria</i> sp.	AB616132*	99
1	372	Actinobacteria	Actinobacteria bacterium sp.	EF019448	99
1	371	Deltaproteobacteria	Deltaproteobacteria bacterium sp.	GQ457070*	99
1	372	Actinobacteria	<i>Marmoricola</i> sp.	AB544079*	99
1	372	Actinobacteria	<i>Actinoplanes</i> sp.	AJ488564*	99
1	367	Firmicutes	Firmicutes bacterium sp.	CU924335*	99
1	372	Acidobacteria	<i>Acidobacterium</i> sp.	FJ568507*	99
1	369	Betaproteobacteria	Betaproteobacteria bacterium sp.	DQ643730*	99
1	372	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i> sp.	GQ351305	100
1	372	Actinobacteria	Actinobacteria bacterium sp.	AB293383*	99
1	372	Actinobacteria	Actinobacteria bacterium sp.	EF662815*	100
1	370	Actinobacteria	Sphingomonadaceae sp.	HM438634*	100
1	372	Actinobacteria	<i>Mycobacterium</i> sp.	GQ369099*	97
1	371	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteria bacterium sp.	FJ688000*	99

Tab. 64 *Fungi* Klon-Bibliothek der schweren Dichte-Fractionen der Bodenvariante NIL nach Inkubation mit ¹³C-Phenol und DNA-SIP (vgl. Abschnitt 3.4.3).

Anzahl der Klone	Länge der Partialsequenz	phylogenetische Einordnung	Nächster Verwandter in NCBI-Datenbank	Accession No.	% Ähnlichkeit
57	603	Basidiomycota	<i>Cryptococcus</i> sp.	AF145324*	99 - 100
1	549	Fungi	Uncultured fungus sp.	AJ875385	99
1	520	Ascomycota	<i>Fusarium</i> sp.	GU566300*	99

Tab. 65 *Fungi* Klon-Bibliothek der schweren Dichte-Fractionen der Bodenvariante NPK nach DNA-SIP und Inkubation mit ¹³C-Phenol (vgl. Abschnitt 3.4.3).

Anzahl der Klone	Länge der Partialsequenz	phylogenetische Einordnung	Nächster Verwandter in NCBI-Datenbank	Accession No.	% Ähnlichkeit
64	603	Basidiomycota	<i>Cryptococcus</i> sp.	AF145324*	99 - 100
1	520	Ascomycota	<i>Fusarium</i> sp.	GU566300*	100
1	582	Ascomycota	<i>Trichoderma</i> sp.	AY154940*	99
1	594	Fungi <i>incertae sedis</i>	Zygomycete sp.	EU428774	98

Tab. 66 *Fungi* Klon-Bibliothek der schweren Dichte-Fractionen der Bodenvariante FYM nach DNA-SIP und Inkubation mit ¹³C-Phenol (vgl. Abschnitt 3.4.3).

Anzahl der Klone	Länge der Partialsequenz	phylogenetische Einordnung	Nächster Verwandter in NCBI-Datenbank	Accession No.	% Ähnlichkeit
53	603	Basidiomycota	<i>Cryptococcus</i> sp.	AF145324*	99 - 100
1	511	Ascomycota	<i>Davidiellaceae</i> sp.	GU055685*	100
1	520	Ascomycota	<i>Verticillium</i> sp.	GU055566	100

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Christoph C. Tebbe danke ich für die Überlassung des außerordentlich interessanten Themas und die Betreuung der Arbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für die vielen guten, hilfreichen Ratschläge und fruchtbaren Diskussionen, die zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats dieser Arbeit und für seine spannenden und unterhaltsamen Vorlesungen, die ihren Anteil daran haben, dass mich mein Weg zur Mikrobiologie führte.

Der DFG danke ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Ines Merbach und ihren Mitarbeitern vom UFZ Leipzig für die Möglichkeit auch kurzfristig in Bad Lauchstädt Probenahmen durchzuführen.

Herrn Dr. Rainer Martens danke ich für seinen schier unermüdlichen Einsatz für mich und mein Projekt, für die vielen hilfreichen Diskussionen, sowie seinen großen Einfallsreichtum bei der Entwicklung von Versuchsfragen und experimentellen Aufbauten. Auch wenn etwas mal nicht auf Anhieb gelang, trug seine ruhige Herangehensweise, sein enormes Fachwissen und sein stets offenes Ohr dazu bei, meine Motivation aufrecht zu erhalten. Lieber Rainer, ich danke dir dafür und hoffe, dass ich dir die Molekularbiologie zumindest etwas näher bringen konnte.

Dem ganzen Team der AG Tebbe gilt mein Dank für die von Beginn an herzliche Aufnahme und die großartige Zusammenarbeit während meiner gesamten Tätigkeit. Seien es nun fachliche Diskussionen über die Gentechnik(gegner) oder die Momente, in denen wir die Wolfsburger Leistungen vom Wochenende rekapitulierten – ich habe mich bei euch immer sehr wohl gefühlt und wäre ohne diese familiäre Atmosphäre vermutlich niemals am Ziel angekommen. Besonders bei Karin und Katja möchte ich mich für ihre Unterstützung bei den praktischen Arbeiten und für das menschliche Miteinander bedanken. Es war mir eine Freude mit euch zusammenzuarbeiten, das Büro zu teilen und das ein oder andere Fachgespräch über TV-Serien bzw. Computerspiele zu führen! Anke und Denis danke ich für ihre Unterstützung bei den Sorptionsexperimenten und hoffe, dass ihr kein Trauma von den zahlreichen „langwierigen“ Fraktionierungen zurückbehalten habt. Bei Anja, Jens und Meike bedanke ich mich für ihre ebenfalls stets offenen Ohren bei fachlichen Fragen und menschlichen Problemen. Nicht vergessen möchte ich auch Britta, Claudia und Jana, die ebenfalls zur Stelle waren, wenn ich Unterstützung benötigte. Zudem gilt mein Dank Michael fürs spontane Korrekturlesen einiger Abschnitte – wenn dies Abenteuerien wäre, hättest du dir dafür auf jeden Fall ein paar zusätzliche Abenteuerpunkte verdient!

Bei Julia, meinem Engel, bedanke ich mich für viele schöne unvergessliche gemeinsame Stunden, für das stetige Motivieren und Aufbauen wenn es mal nicht so gut lief, sowie für hilfreiche Anmerkungen zu dieser Arbeit. Danke, dass du immer für mich da warst!

Meinen Eltern, Eitel-Friedrich und Birgit Neumann, meiner Schwester Nicole und meinen Großeltern Gertraud und Edmund Maasberg danke ich für den immer vorhandenen familiären Rückhalt und viele erbauliche Gespräche.

Zu guter letzt bedanke ich mich bei meinen Freunden: Daniel, Holger, Kicker, Nicole, Rouven, Sascha, Tobi... ohne euch wäre das Leben deutlich langweiliger!